ZUM ABTRENNEN UND EINENGEN VON STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXIN B AUS LEBENSMITTELN MIT HILFE DER ULTRAFILTRATION

Georg Ludwig Andreas Schegger

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0036

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Professor Dr. G. Terplan)
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Zum Abtrennen und Einengen von Staphylokokken-Enterotoxin B aus Lebensmitteln mit Hilfe der Ultrafiltration

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Georg Ludwig Andreas Schegger
aus
München

München 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. B. Gedek

Tag der Promotion: 23. Februar 1979

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1	Allgemeine Eigenschaften von Staphylokokken-Enterotoxinen	2
2.2	Verfahren zum serologischen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln	4
2.2.1	Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln mittels Geldiffusionstest	6
2.2.1.1	Abtrennen der Enterotoxine mittels chromatographischer Prozesse	6
2.2.1.2	Abtrennen der Enterotoxine mittels chromatographischer Prozesse und Entfernen den Nachweis störender Lebensmittelbestandteile mit physikalischen oder chemischen Verfahren	7
2.2.1.3	Abtrennen der Enterotoxine und Entfernen den Nachweis störender Lebensmittelbestandteile mit physikalischen oder chemischen Verfahren	11
2.2.2	Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln mittels umgekehrter passiver Haemagglutination	15
2.2.3	Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln mittels RIA	16
2.2.4	Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln mittels ELISA	17
2.3	Ultrafiltration	18
3.	Untersuchungen	21
3.1	Orientierende Versuche zur Eignung der Ultrafiltration für das Konzentrieren von gereinigtem SEB	21
3.1.1	Material und Methodik	21
3.1.2	Versuchsdurchführung und Ergebnisse	23

		Seite
3.2	Versuche zur Eignung der Ultrafiltration zum Abtrennen und Konzentrieren aus Lebensmitteln extrahierten Enterotoxins	27
3.2.1	Material und Methodik	27
3.2.2	Ergebnisse	33
4.	Besprechung der Ergebnisse und Diskussion	37
5.	Zusammenfassung	48
6.	Literaturverzeichnis	52

1. Einleitung

Für den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln sind - seitdem spezifische Antiseren zur Verfügung stehen - viele serologische Methoden beschrieben worden. Für routinemäßige Untersuchungen haben sich bisher jedoch nur die auf der Präzipitation von Antigen und Antikörper basierenden Gel-Diffusionstests, insbesondere in Form der radialen Doppeldiffusion, bewährt. Diese Tests können jedoch nicht zum unmittelbaren Nachweis der Enterotoxine in Lebensmitteln eingesetzt werden. Häufig sind die Toxinmengen nämlich so gering, daß sie nicht mehr sichtbar erfaßt werden. Außerdem können im Lebensmittel enthaltene Stoffe positive Reaktionen überdecken oder falsch-positive Reaktionen bewirken. Aus diesem Grund sind verschiedene Methoden erarbeitet worden, um die Enterotoxine vor dem eigentlichen Nachweis aus dem Lebensmittel zu extrahieren, von festen und löslichen Lebensmittelbestandteilen abzutrennen und zu konzentrieren. Bei den meisten dieser Verfahren kommt es jedoch zu erheblichen Toxinverlusten, so daß in geringer, aber immer noch krankmachender Dosis (0,1 mcg/100 g) vorhandene Enterotoxine nicht mehr erfaßt werden können. Darüber hinaus sind viele dieser Verfahren sehr zeitaufwendig.

Es sollte daher geprüft werden, ob und unter welchen Voraussetzungen die Ultrafiltration sich zum Abtrennen und Konzentrieren der makromolekularen Enterotoxine von Begleitstoffen eignet. Zu diesem Zwecke sollten entsprechende Versuche mit teilweise gereinigtem bzw. ungereinigtem Enterotoxin B und mit enterotoxinhaltigen Lebensmitteln durchgeführt werden. Dabei war von besonderem Interesse, ob sich bei Anwenden der Ultrafiltration auch noch Mengen von 0,1 mcg Enterotoxin/100 g Lebensmittel im Gel-Diffusionstest nachweisen lassen.

2. Schrifttum

2.1. Allgemeine Eigenschaften von Staphylokokken-Enterotoxinen

Staphylokokken-Enterotoxine sind Proteine, die von einigen Staphylococcus aureus-Stämmen gebildet werden. Der Literaturübersicht in der Dissertation von MAYER (1975) ist zu entnehmen, daß von den verschiedenen Autoren aus Rohmilch bzw. Mastitissekret isolierten koagulasepositiven Staphylokokken bis zu 10 % bzw. 15 % enterotoxinogen waren. Von den aus humanem Material herausgezüchteten koagulasepositiven Staphylokokken waren allerdings bis zu 75 % Enterotoxinproduzenten. (MAYER, 1975). Da für die Freisetzung der Enterotoxine keine Zellysis erforderlich ist, handelt es sich um bakterielle Exotoxine (MINOR und MARTH, 1976), die in der Bakterienwand synthetisiert werden (FRIEDMAN und WHITE, 1965). Bisher sind auf Grund ihrer spezifischen Reaktion mit verschiedenen Antikörpern sechs Enterotoxintypen identifiziert worden: A (CASMAN, 1960), B (BERGDOLL, SURGALLA und DACK, 1959), C (BERGDOLL, BORJA und AVENA, 1965) mit den Varianten C_1 (BORJA und BERGDOLL, 1967) und C_2 (AVENA und BERGDOLL, 1967), D (CASMAN et al., 1967), E (BERGDOLL et al., 1971) und F (THOTA, TATINI und BENNETT, 1973). Es ist nicht bekannt, wieviele noch nicht identifizierte Enterotoxintypen außerdem existieren, doch sind bereits mehrere im Affenfütterungstest positive Staphylococcus aureus-Stämme gefunden worden, die mit den bisher bekannten Antiseren nicht spezifisch reagierten (BERGDOLL und ROBBINS, 1973). Einige der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Enterotoxine (mit Ausnahme der Typen D und F) sind in der Übersicht 1 aufgeführt.

Auch hinsichtlich der Stabilität der Enterotoxine gegenüber physikalischen bzw. chemischen Einflüssen (Erhitzen, Zusatz von Desinfektionsmitteln etc.) bestehen z.T. deutliche Unterschiede zwischen den Typen (SCHULTE, 1978).

Übersicht 1: Physikalische und chemische Eigenschaften von Staphylokokken-Enterotoxinen (nach MINOR und MARTH, 1976)

	Enterotoxin				
	A	B	C_1	C_2	E
Molekulargewicht	27 800	28 366	34 100	34 000	29 600
Isoelektr. Punkt	7,3	8,6	8,6	7,0	7,0
Stickstoffgehalt (%)	16,2	16,1	16,2	16,0	--
Emetische Dosis mçg/Affe	5	5	5	5 - 10	10 - 20
Absorptionsmaximum (mμ)	277	277	277	277	277
Extinktion $(^{1\,\%}_{1\,cm})$	14,6	14,4	12,1	12,1	12,5
Sedimentationskoeffizient	3,03	2,78	3,00	2,90	2,60
Diffusionskoeffizient	9,80	8,22	8,10	8,10	--
Reduzierte Viskosität (ml/g)	4,07	3,81	3,4	3,7	--
Zahl der Aminosäurereste	240	239	296	294	259

Die leicht wahrnehmbaren Symptome einer Staphylokokken-Intoxikation wurden des öfteren beschrieben (DACK, 1956; BERGDOLL, 1970; DANGERFIELD, 1973; MINOR und MARTH, 1976; u.a.). Die wichtigsten Merkmale sind Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. Sie zeigen sich im allgemeinen 1 - 6 Stunden nach Verzehr des enterotoxinhaltigen Lebensmittels. Die anderen Symptome sind: Schweißausbrüche, Kopfschmerzen, Schwindelgefühle, Muskelkrämpfe und Erschöpfung, abhängig von der Kondition und Konstitution des Konsumenten und der aufgenommenen Dosis mehr oder weniger stark ausgeprägt. Die Körpertemperatur kann erhöht oder subnormal sein. In schweren Fällen können Blut und Schleim im Erbrochenen bzw. Stuhl vorhanden sein; seltener kommt es zu einem Schock-bedingten Kreislaufkollaps oder gar zum Tod. Der Zustand des Erkrankten bessert sich im Durchschnitt innerhalb der ersten 24 Stunden, spätestens aber nach 72 Stunden. Nach Modellversuchen von DANGERFIELD (1973) sind Staphylokokken-Intoxikationen bei der Aufnahme von 0,14 mcg Enterotoxin/kg KGW zu erwarten. Doch hat sich erst vor kurzem gezeigt, daß bereits Mengen von weniger als 0,1 mcg/Person hierfür ausreichen (BERGDOLL, 1978).

2.2 Verfahren zum serologischen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln

In der Literatur sind viele verschiedene Methoden zum Enterotoxinnachweis beschrieben worden. (Übersichten dazu bei BERGDOLL, 1970 und 1972; HOLBROOK und BAIRD-PARKER, 1975; SOMMERFELD und TERPLAN, 1975; MINOR und MARTH, 1976). Die Eignung dieser Verfahren zum Nachweis von Enterotoxinen in Lebensmitteln hängt insbesondere von deren Empfindlichkeit, Spezifität und Praktikabilität ab. Der im folgenden wiedergegebenen Übersicht von UNTERMANN (1978) ist zu entnehmen, daß Radio-Immuno-Assay (RIA), Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA), Bakteriophagen-Immunoassay, umgekehrte passive Hämagglutination und Latex-Test die

empfindlichsten Verfahren sind. Die beiden letztgenannten Tests haben sich aufgrund mangelhafter Spezifität und Praktikabilität als ungeeignet erwiesen (BERGDOLL, 1978; ZAADHOF, 1978). Es ist aber nicht auszuschließen, daß RIA bzw. ELISA in nicht zu ferner Zukunft auch für Routineuntersuchungen von Lebensmitteln eingesetzt werden können. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden für diese Zwecke noch Gel-Diffusionstests verwendet, und zwar in Form der Objektträger-Technik (WADSWORTH, 1957).

Übersicht 2: Verfahren zum serologischen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen

Nachweisverfahren	Empfindlichkeit (mcg/ml)	Geprüfte Enterotoxine
Agar-Gel-Diffusionstest nach		
Oudin	1,0	ABC
Oakley	0,1	ABC
Ouchterlony	5,0 - 20,0	ABC
Wadsworth	0,1 - 1,0	ABCDE
Optimum-Sensitivity	0,5	ABCDE
Plate-Technik		
Immunofluoreszenz	0,05 - 1,0	AB
Elektroimmunanalyse	0,1	AB
Passive Haemagglutination	0,1 - 1,0	B
Umgekehrte passive Haemagglutination	0,0015	AB
Latex-Test	0,001	AB
Radio-Immunoassay	0,0001 - 0,001	ABC
Enzym-Immunoassays	0,0001 - 0,003	AB
Bakteriophagen-Immunoassay	0,0037 - 0,0082	B

2.2.1 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln mittels Gel-Diffusionstests

Gel-Diffusionstests sind die klassischen serologischen Nachweisverfahren. Im Gegensatz zu RIA oder ELISA sind sie aber für ein direktes Feststellen der in Lebensmitteln meist nur in geringen Mengen vorhandenen Enterotoxine zu wenig empfindlich (CASMAN und BENNETT, 1965; HALL, ANGELOTTI und LEWIS, 1965; BERGDOLL, 1970; SOMMERFELD und TERPLAN, 1975; UNTERMANN, 1978; siehe Übersicht 2).

Außerdem können in Lebensmitteln enthaltene Substanzen eine positive Reaktion überdecken oder eine falsch-positive Reaktion bewirken. Es wurden daher verschiedene Methoden für die Extraktion der Enterotoxine aus Lebensmitteln, ihr Konzentrieren sowie Abtrennen von festen und löslichen Lebensmittelbestandteilen erarbeitet. Die Verfahren beruhen im wesentlichen auf

a) dem Durchführen chromatographischer Prozesse, z.B. selektive Adsorption des aus dem Lebensmittel extrahierten Enterotoxins an Ionenaustauscher und/oder
b) dem Entfernen den Nachweis störender Lebensmittelbestandteile mittels physikalischer und/oder chemischer Verfahren (Siehe auch tabellarische Übersicht von SOMMERFELD und TERPLAN, 1975).

2.2.1.1 Abtrennen der Enterotoxine mittels chromatographischer Prozesse

Dem Schrifttum ist zu entnehmen, daß CASMAN, McCOY und BRANDLY (1963) als Erste überhaupt ein Verfahren zur Extraktion von Enterotoxin aus Lebensmitteln publizierten. Danach wurde Fleisch mit Aqua dest. im Verhältnis 1 : 5 homogenisiert. Anschließend erfolgte Einstellen des Breies auf pH 6,8 und 5-10minütiges Zentrifugieren. Der Überstand wurde mit der 19fachen Menge 0,01 m Phosphatpuffer (PB) -pH 6,8 - verdünnt und durch eine mit Carboxymethylcellulose (CMC) gefüllte Säule geschickt. Nach Durchspülen der Säule mit dem gleichen

Puffer wurde mit 0,1 m PB - pH 6,8 - eluiert. Vor dem serologischen Enterotoxinnachweis wurde das Eluat mit Hilfe eines LKB Ultrafilters und gegen Polyvinylpyrrolidon konzentriert. CASMAN und BENNETT (1965) ergänzten und verbesserten später diese Methode. Sie benutzten für die Extraktion aus 20 g Lebensmittel 100 ml 0,2 m NaCl und stellten vor dem Zentrifugieren das Homogenisat auf pH 7,4 bis 7,5 ein. Nach diesem Analysenschritt wurde das aufgeschlämmte Sediment auf pH 7,4 bis 7,5 eingestellt, zentrifugiert und der gesammelte Extrakt in einem Cellophanschlauch gegen PEG (polyethylenglykol) eingeengt. Dieser wäßrige Extrakt wurde nun mit 20-facher Menge Aqua dest. und 20facher Menge 0,01 m PB pH 6,0 verdünnt. Mit 0,2 m PB, der 0,2 m NaCl enthielt - pH 7,4 - wurde eluiert.

Diese Verfahren spielen heute keine Rolle mehr, sie sind ersetzt worden durch im folgenden Abschnitt beschriebene Methoden.

2.2.1.2. Abtrennen der Enterotoxine mittels chromatographischer Prozesse und Entfernen den Nachweis störender Lebensmittelbestandteile mit physikalischen oder chemischen Verfahren

ZEHREN und ZEHREN (1968), die 1967 erhebliche Mengen Cheddar-Käse auf die Anwesenheit von Enterotoxin A untersuchten, modifizierten das Verfahren von CASMAN und BENNETT (1965) dahingehend, daß sie den konzentrierten Überstand vor der Zugabe von Aqua dest. und 0,01 m PB wie auch das konzentrierte Eluat mit Chloroform versetzten und zentrifugierten. Außerdem wurde das mit Chloroform behandelte Eluat nochmals gegen PEG konzentriert und schließlich lyophilisiert.

CASMAN (1967) wollte die bei proteinreichen Lebensmitteln störenden Eiweiße ebenfalls mit $CHCl_3$ entfernen (bei Fleisch vor und nach Konzentrieren des Extraktes, bei Käse nur nach dem Einengen). Er verdünnte das an CMC zu adsorbierende Material mit der 40fachen Menge 0,005 m PB pH 5,7. Sonst bestanden jedoch kaum Unterschiede zu der von ZEHREN und ZEHREN (1968) publizierten Methode.

Diese beiden Verfahren wurden von vielen anderen Untersuchern in unveränderter Form übernommen oder dienten als Grundlage für weitere Änderungen. BARBER und DEIBEL (1972) gingen z.B. beim Untersuchen von Wurst folgendermaßen vor: Nach Filtrieren des mit 0,2 mNaCl gewonnenen, 600 ml betragenden Homogenisates gaben sie $CHCl_3$ zu. Dem Zentrifugieren folgte Einstellen der wäßrigen Phase mit 6 nHCl auf pH 4,5. Die Probe wurde dann wieder zentrifugiert, auf pH 7,0 eingestellt und gegen PEG konzentriert. Erneutem Zentrifugieren des Extraktes schloß sich Erhitzen des Überstandes auf 56°C und Abkühlen an. Nach dreimaligem $CHCl_3$-Behandeln und Zentrifugieren wurde auf pH 4,5 eingestellt und erneut zentrifugiert. Der auf pH 6,5 angehobene Überstand wurde bei 4°C 30 Minuten mit CMC gerührt und anschließend in eine Säule gegeben. Mit 0,2 m PB in 0,2 m NaCl - pH 7,5 - wurde dann das gesuchte Enterotoxin eluiert. Das gegen PEG eingeengte Eluat wurde danach mit Chloroform behandelt. Diese Probe konzentrierten die Autoren nochmals gegen PEG und lyophilisierten sie vor dem serologischen Nachweis. Demgegenüber änderten BENNETT, ARCHER und AMOS (1974) bzw. TROLLER und STINSON (1975) das Verfahren nur geringfügig: Erstere empfahlen 0,05 m PB in 0,05 m NaCl - pH 6,5 - zum Eluieren. Letztere adsorbierten mit 0,01 m PB - pH 5,5 - und eluierten mit 0,2 m PB in 0,2 m NaCl - pH 7,5. HALL, ANGELOTTI und LEWIS (1965) setzten Amberlite CG 50 statt CMC ein. Auch sonst wich das Verfahren gegenüber der von CASMAN und Mitarb. an der Food and Drug Administration erarbeiteten Methode in einigen Dingen ab. Nach Homogenisieren des Lebensmittels mit 0,02 m PB - pH 6,2 bis 6,4 -, wurde die Probe 30 Minuten auf 50°C erhitzt und anschließend 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dem Zentrifugieren folgte Verdünnen des Überstandes mit Aqua dest. im Verhältnis 1 : 3 und Verbringen auf eine Säule mit äquilibriertem Amberlite (0,02 m PB - pH 6,2 bis 6,4). Eluiert wurde mit 0,2 m PB - pH 6,4 bis 6,8. Vor dem serologischen Nachweis wurde das Eluat gegen Polyvinylpyrrolidon konzentriert.

REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974) verwendeten zum Abtren-

nen ebenfalls Amberlite CG 50. Sie arbeiteten aber nicht mit Säulen, sondern im "Batch-Verfahren". Damit wie auch durch den Trypsinzusatz, der eine Proteolyse von Begleitproteinen bedingt, verminderten sie den für Extraktion, Reinigen und Konzentrieren des Enterotoxins erforderlichen Zeitaufwand erheblich. Die Autoren gingen im einzelnen wie folgt vor: Nach intensivem Zerkleinern des festen Lebensmittels mit Aqua dest. stellten sie das pH auf 4, 5 bis 5, 0 ein und zentrifugierten. Der Überstand wurde auf pH 7, 5 gebracht, mit Chloroform extrahiert und erneut zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde nochmals auf pH 4, 5 eingestellt, zentrifugiert und wiederum auf pH 7, 5 gebracht. Anschließend erfolgte Einrühren in äquilibriertes (0, 005 m PB - pH 5, 6) Amberlite. Nach einer Stunde wurde der Austauscher auf einem Buchner-Trichter mit 0, 015 m PB und 0, 09 % NaCl - pH 5, 9 - gewaschen, bevor mit ca. 30 ml 0, 15 m Na_2HPO_4 mit 0, 9 % NaCl pH 6, 8 eluiert wurde. Anschließend wurde das Eluat mit gereinigtem Agar 1 Stunde gerührt und nach Entfernen des Agars gegen PEG konzentriert. Das Konzentrat wurde schließlich mit Chloroform behandelt und zentrifugiert. Anschließendes Lyophilisieren konzentrierte den Extrakt noch einmal. Das Lyophilisat wurde dann vor Ansatz des serologischen Tests in wäßriger Trypsinlösung gelöst und eine halbe Stunde stehengelassen.

Auch STOJANOW und SCHENK (1966, 1970), STOJANOW und NESTOROW (1967) sowie NISKANEN und NURMI (1976) bzw. NISKANEN und LINDROTH (1976) benutzten die Säulenchromatographie zum Isolieren des Enterotoxins. Sie verwendeten jedoch nicht Ionenaustauscher, sondern wählten die Gelchromatographie.

STOJANOW und SCHENK (1966) extrahierten das Enterotoxin mit $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ im Bereich des pH-Wertes 4, 0 bis 7, 5. Den gepufferten Extrakt erhitzten sie für die Dauer von 30 bis 60 Minuten auf 80 bis 100°C. Der Säurepräzipitation mit Esbach-Reagenz im Verhältnis 0, 5 : 4 zur Probe schloß sich Zentrifugieren an. Nach einstündigem Aufbewahren bei 4°C wurde der Extrakt entfettet und vor dem erneuten

Zentrifugieren durch Zugabe von NaOH auf pH 5, 0 bis 7, 0 eingestellt. Biogel P 10 konzentrierte dann schnell den Überstand. Durch Gelfiltration mit passender handelsüblicher Gelsubstanz ("Dextran" oder "Polymer") wurde Enterotoxin von den Begleitstoffen abgetrennt. Mit dem konzentrierten Eluat führten die Verfasser dann den Enterotoxinnachweis durch. Spätere Publikationen von STOJANOW und Mitarbeitern präzisierten die methodischen Angaben (Extraktion mit 0, 02 m PB - Erhitzen auf 85°C - Einstellen der entfetteten Probe auf pH 6, 8 - Gelfiltration mit Sephadex G-100 oder G-50 - Elution mit 0, 02 m PB pH 6, 8), oder änderten sie ab (Säurepräzipitation mit Esbach-Reagenz im Verhältnis 1 : 2). NISKANEN und NURMI (1976) gingen bis zum Konzentrieren gegen PEG wie BARBER und DEIBEL (1972) vor (siehe S.8). Das Konzentrat brachten sie auf eine Sephadex G-25-Säule und eluierten mit 0, 1 m PB - pH 7, 5. Die erneut gegen PEG eingeengte Probe wurde mit $CHCl_3$ behandelt, zentrifugiert und der Überstand auf eine Bio-Gel-Säule gegeben. Eluiert wurde mit dem beim Sephadex benutzten Puffer. Nach erneutem Konzentrieren gegen PEG und Behandeln mit $CHCl_3$ wurde die Probe lyophilisiert.

Statt konventioneller chromatographischer Verfahren bedienten sich GENIGEORGIS und KUO (1976) der Affinitätschromatographie. Dies hat den Vorteil, daß Reinigen und Konzentrieren des Enterotoxins in einem Schritt erfolgen. Sie stellten zuerst den mit Aqua dest. homogenisierten Extrakt auf pH 4, 5 ein und zentrifugierten. Den dann auf pH 7, 2 gebrachten Überstand mischten sie im "Batch-Verfahren" 2 Stunden mit Sepharose-Antikörper-Konjugat. Diese Suspension wurde dann auf eine Säule gegeben und mit PBS gewaschen. Das anschließende Eluieren des Enterotoxins erfolgte mit Glyzinpuffer - pH 2, 8. Der serologische Nachweis in der Probe wurde nach Einstellen auf pH 7, 2 durchgeführt.

Von den in diesem Kapitel beschriebenen Methoden haben sich nur diejenige von CASMAN (1967) mit ihren verschiedenen Modifikationen

(ZEHREN und ZEHREN, 1968; BARBER und DEIBEL, 1972; BENNETT, ARCHER und AMOS, 1974) und diejenige von REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974) bewährt. Die Verfahren von HALL, ANGELOTTI und LEWIS (1965), STOJANOW und Mitarbeiter (1966, 1967, 1970) sowie NISKANEN und NURMI (1976) haben demgegenüber diese Bedeutung nicht erlangt. Dies ist in erster Linie darauf zurückzuführen, daß die letztgenannten Extraktionsverfahren nicht geeignet waren, noch geringste Enterotoxinmengen (0,125 bis 0,25 mcg/100 g Lebensmittel)mit dem Gel-Diffusionstest nachzuweisen. (ZAADHOF, 1978). Nur diese Empfindlichkeit gewährleistet, daß ein Lebensmittel keine Intoxikationen auslösenden Staphylokokken-Enterotoxine enthält. Auch wenn mit dem Verfahren nach CASMAN (bzw. dessen Modifikationen) und REISER, CONAWAY und BERGDOLL noch geringe Enterotoxinmengen nachgewiesen werden können, so ist die Wiedergewinnungsrate doch sehr niedrig. NISKANEN und LINDROTH (1976) konnten an radiomarkiertem Enterotoxin A aufzeigen, daß z.B. mit dem letztgenannten Verfahren nur 3,6 % des zugegebenen Enterotoxins wieder gefunden wurden. Weitergehende Untersuchungen dieser Autoren ergaben dann, daß insbesondere die chromatographischen Schritte aufgrund unvollständiger bzw. zu starker Adsorption erhebliche Enterotoxinverluste bedingten.

2.2.1.3 Abtrennen der Enterotoxine und Entfernen den Nachweis störender Lebensmittelbestandteile mit physikalischen oder chemischen Verfahren

Bei den Verfahren, bei denen keine chromatographischen Prozesse Anwendung finden, werden die Extrakte nur einem oder mehreren der in der Übersicht 3 aufgeführten Verfahren unterworfen.

Übersicht 3: Verfahren zum Entfernen den Enterotoxinnachweis störender Lebensmittelbestandteile

Verfahren	Autoren
Erhitzen auf 50°C	HALL, ANGELOTTI und LEWIS (1963); READ et al. (1965a, 1965b)
Ansäuern auf pH 4,5 (4,0)	READ et al. (1965a, 1965b); GASPER (1973); NISKANEN und LINDROTH (1977); SINELL und MENTZ (1978)
Chloroformextraktion	READ et al. (1965a, 1965b); GASPER (1973); NISKANEN und LINDROTH (1977); SINELL und MENTZ (1978)
Trypsinzusatz	NISKANEN und LINDROTH (1977); SINELL und MENTZ (1978)
Zusatz von Pseudomonas-Peptidase	NISKANEN und LINDROTH (1977);
Ammoniumsulfat-Zusatz	NISKANEN und LINDROTH (1977)

HALL, ANGELOTTI und LEWIS (1963) extrahierten das Enterotoxin mit 0,2 m PBS (pH 7,2), exponierten diesen Ansatz für 15 Minuten einer Temperatur von 50°C und ließen ihn danach 45 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Der beim anschließenden Zentrifugieren gewonnene klare Überstand diente als Antigen. READ et al. (1965b) extrahierten anfangs das Enterotoxin mit 0,04 m Veronalpuffer (pH 7,2) und zentrifugierten. Der Überstand wurde mit HCl auf pH 4,5 einge-

stellt und erneut zentrifugiert. Den hierbei gewonnenen Überstand brachten die Verfasser auf pH 7,2, bevor sie ihn ähnlich wie zuvor HALL, ANGELOTTI und LEWIS 10 Minuten auf 50°C erhitzten und wiederum zentrifugierten. Dieser Überstand diente dann für den Enterotoxinnachweis. Da mit dieser Methodik jedoch nur relativ hohe Enterotoxinmengen wiederzufinden waren, wurde das Verfahren etwas abgewandelt und durch mehrere Chloroformextraktionen und Einengen gegenüber Polyvinylpyrrolidon ergänzt. Beim Untersuchen von Milch wurde auf die Zugabe von Veronalpuffer verzichtet und mit HCl auf pH 4,5 angesäuert. (READ et al., 1965a). Weitere Unterschiede zur vorher beschriebenen Methodik bei festen Lebensmitteln bestanden jedoch nicht.

NISKANEN und LINDROTH (1977) extrahierten 100 g Lebensmittel mit 140 ml Aqua dest., zentrifugierten das Homogenisat und stellten den Überstand auf pH 4,5 ein. Hierauf wurde zentrifugiert, der Überstand mit 5 n NaOH auf pH 7,5 gebracht und nach einer $CHCl_3$-Extraktion erneut zentrifugiert. Der wäßrigen Phase setzten die Autoren Trypsin und Pseudomonaspeptidase zu, ließen den Ansatz 2 Stunden bei 37°C stehen und gaben dann unter ständigem Rühren Ammoniumsulfat zu. Nach 15 Minuten wurde im Eisbad auf 4°C abgekühlt und zentrifugiert. Den Überstand engten NISKANEN und LINDROTH auf die Hälfte des Anfangsvolumens gegen PEG ein. Das Konzentrat wurde mit $CHCl_3$ extrahiert, zentrifugiert und nach Filtrieren lyophilisiert.

SINELL und MENTZ (1978) lösten aus festen Untersuchungsmaterialien die Enterotoxine im Verhältnis 1 : 7 mit 0,02 m PB pH 7,5 heraus, zentrifugierten und stellten den Überstand auf pH 7,5 ein. Mit diesem führten die Autoren eine Chloroform-Extraktion (Verhältnis 3+1) durch, um anschließend zu zentrifugieren. Nach einer Säurepräzipitation der wäßrigen Phase (pH 4,0) wurde erneut zentrifugiert, der Überstand auf pH 6,8 gebracht und dann in 30 %igem Carbowax konzentriert. Nach einer eventuellen pH-Korrektur (pH 7,5) wurde der konzentrierte Ex-

trakt mit 0,2%iger Trypsinlösung (Verhältnis 19+1) vermischt und 90 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend erfolgte zweimaliges Behandeln mit Chloroform, Konzentrieren gegen Carbowax und Lyophilisieren. Das von GASPER (1973) beschriebene Verfahren weicht von den anderen in diesem Abschnitt erwähnten Methoden ab. Es setzt die Ultrafiltration zum Konzentrieren und teilweisen Reinigen aus Lebensmitteln extrahierten Enterotoxins ein. Im einzelnen erwähnte dieser Autor folgende Methodik:

Nach Homogenisieren von jeweils 100 g eines festen Nahrungsmittels mit 250 ml 0,05 m Barbitalpuffer (pH 8,6) und Zentrifugieren wurde der gewonnene Überstand mehrere Male einer Chloroformextraktion unterzogen, um Fette und Lipoproteine weitestgehend zu entfernen. Die abgeheberte wäßrige Phase stellte der Autor auf pH 4,5 ein, zentrifugierte sie und brachte den pH-Wert des Überstandes auf pH **8**,6. Homogenisierte Milch wurde auf pH 4,5 angesäuert und zentrifugiert. Nach dem Abhebern der flüssigen Phase wurde das Sediment nochmals mit 0,05 m Barbitalpuffer homogenisiert, auf pH 4,5 angesäuert und zentrifugiert. Nach Vermischen des hierbei gewonnenen Überstandes mit der Molke liefen die weiteren Extraktionsschritte wie bei den festen Nahrungsmitteln beschrieben ab. Nach dem Einstellen auf pH 8,6 brachte der Autor den klaren Lebensmittelextrakt in eine Ultrafiltrationsanlage mit einer XM-100 A Membran zum Ausschluß von Partikeln mit einem Molekulargewicht von über 100 000. Das Permeat wurde in einer anderen Ultrafiltrationszelle, die mit einer PM-10 Membran (Molekulargewichtausschluß 10 000) versehen war, bis auf 10 ml konzentriert. Eine dritte kleinere Ultrafiltrationszelle engte schließlich auf 1 ml ein. Dieses Retentat prüfte GASPER auf Enterotoxine.

Von den in diesem Abschnitt aufgeführten Verfahren wurden nur jene von READ et al. (1965a und b) häufiger angewandt, während die Verfahren von HALL, ANGELOTTI und LEWIS (1963) sowie GASPER (1973) bisher ohne Bedeutung blieben. Bei den Methoden von READ werden

die Lebensmittelbestandteile nicht in ausreichendem Maße entfernt und stören den Enterotoxinnachweis (MINOR und MARTH, 1976). Sie sind den Extraktionsverfahren von CASMAN (1967) bzw. REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974), die im vorigen Abschnitt referiert wurden, deutlich unterlegen. Ob das erst im letzten Jahr von NISKANEN und LINDROTH beschriebene Verfahren sich als besser gegenüber den letztgenannten erweisen wird, kann bisher noch nicht beurteilt werden. Die von SINELL und MENTZ (1978) publizierte Extraktionsmethode wird sich jedoch aufgrund der geringen Nachweisgrenze von ca. 5 mcg Enterotoxin in 100 g Lebensmittel kaum durchsetzen (BENNETT, 1978; BERGDOLL, 1978; ZAADHOF, 1978).

2.2.2 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln mittels umgekehrter passiver Haemagglutination

SILVERMAN, KNOTT und HOWARD (1968) homogenisierten die Proben (außer Milch und Käse) zu gleichen Teilen mit destilliertem Wasser, verdünnten das Gemisch weiter $\overline{aa}$ mit 0,02 m PBS (pH 6,4) und erhitzten es auf 50°C für 15 Minuten. Nach 45-minütigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde das Gemisch zentrifugiert und anschließend die klare Flüssigkeit zwischen Sediment und oberer Fettschicht abgesaugt, um sie zu filtrieren. Käse und Milch bereiteten obige Verfasser nach den von READ et al. (1965a und b) publizierten Verfahren auf. BENNETT et al. (1973) zerkleinerten 20 g Wurst mit 20 ml 0,15 m acetatgepufferter Kochsalzlösung (pH 4,6) für 3 - 4 Minuten im Waring Blendor. Die homogenisierten Proben wurden für 15 Minuten auf 50°C erhitzt, anschließend zentrifugiert und nach Filtrieren auf pH 6,4 eingestellt. Bei Milch und Milchprodukten gingen die Autoren ähnlich wie zuvor SILVERMAN, KNOTT und HOWARD nach dem von READ et al. (1965a und b) beschriebenen Extraktionsverfahren vor; sie verwendeten allerdings zur Extraktion 0,04 m phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH 7,2) und nicht Veronalpuffer.

Schließlich benutzten REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974) bei der umgekehrten passiven Haemagglutination das bereits an anderer Stelle beschriebene (Seite 8), von ihnen entwickelte Extraktionsverfahren. Zum Unterschied gegenüber dem Enterotoxinnachweis mit dem Gel-Diffusionstest waren jedoch nicht alle Extraktionsschritte erforderlich.

Die umgekehrte passive Haemagglutination ist jedoch vermutlich nicht geeignet zum Nachweis von Enterotoxinen in Lebensmitteln. Es treten häufig falsch-positive Reaktionen auf (BENNETT et al., 1973). Das Verfahren ließ sich außerdem nicht standardisieren (BERGDOLL, REISER und SPITZ, 1976).

2.2.3 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln mittels RIA

Es ist logisch, daß eine so hochempfindliche (s. auch Übersicht 2) und präzise Methode wie der RIA auch zum Messen von Enterotoxinen in Lebensmitteln eingesetzt wurde (FEY, 1978a). Die Mehrzahl der mit dem RIA beschriebenen Extraktionsverfahren beschränkt sich auf Homogenisieren des Lebensmittels und Zentrifugieren. Dabei bestehen gewisse Unterschiede hinsichtlich der einzumischenden Flüssigkeit. BENNETT et al. (1973) sowie COLLINS et al. (1973) wählen Boratpuffer mit 0,7 % bovinem Serumalbumin (BSA), ROBERN et al. (1975) 0,05 m PB (pH 7,4), LINDROTH und NISKANEN (1977) 0,02 m NaCl-Lösung (pH 7,5), während ORTH (1977) 0,07 m PBS (pH 7,2) nahmen. JOHNSON, BUKOVIC und KAUFFMANN (1973), die zum Extrahieren 1%iges BSA benutzten, stellten den Überstand vom Zentrifugieren zusätzlich auf pH 7,4 - 7,5 ein und zentrifugierten vor Durchführen des RIA ein weiteres Mal. Milch wurde von ihnen ähnlich behandelt, wenn man davon absieht, daß sie auf pH 4,5 eingestellt und nicht mit BSA in PBS versetzt wurde. Auch POBER und SILVERMAN (1977) extrahierten - außer bei Milch, die sie vor dem RIA nur auf pH 7,2 einstellten. Die Autoren zerkleinerten feste Lebensmittel in PBS und

stellten das Homogenisat auf pH 7,2 ein, bevor sie zentrifugierten. Nach Einstellen des Überstandes auf pH 4,5 und Stehenlassen bei 50°C (30 Minuten) wurde erneut zentrifugiert, die flüssige Phase auf pH 7,2 eingestellt und nochmals zentrifugiert. Vor dem RIA wurde die Probe mit Chloroform behandelt. NIYOMVIT, STEVENSON und McFEETERS (1978) wählten eine andere Variante des RIA zum Enterotoxinnachweis, nämlich einen Affinitäts-Radioimmunassay. Milchproben wurden nur auf pH 7,5 eingestellt, Hamburger dagegen im Verhältnis von 1 : 1 mit 0,05 m PBS versetzt, auf pH 7, 5 gebracht, homogenisiert und zentrifugiert. Den Überstand ließen sie 30 Minuten im Kühlschrank stehen (zwecks Erstarren und leichteren Entfernen des Fettes), bevor sie ihn filtrierten. Dieses Filtrat bzw. die auf pH 7,5 angehobene Milch brachten NIYOMVIT, STEVENSON und McFEETERS (1978) dann auf eine mit Antikörper-Gel gefüllte Säule, um den Affinitäts-RIA durchzuführen. Dieser RIA zeichnet sich dadurch aus, daß die Ergebnisse bereits nach 1 1/4 Stunden vorliegen, während für die konventionellen Formen des RIA ca. 24 Std. benötigt werden (NIYOMVIT, STEVENSON und McFEETERS, 1978).

Als Routineverfahren hat sich der RIA bisher noch nicht durchsetzen können (BERGDOLL, REISER und SPITZ, 1976; UNTERMANN, 1978; ZAADHOF, 1978). Dies ist darauf zurückzuführen, daß hochgereinigte, radioaktiv markierte Enterotoxine nicht in ausreichender Menge verfügbar sind und ein erheblicher apparativer Aufwand erforderlich ist.

2.2.4 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln mittels ELISA

Der ELISA-Test ähnelt im Prinzip dem schon länger bekannten Solid-Phase-RIA. Er basiert darauf, daß enzymmarkiertes Antigen mit nichtmarkiertem Antigen der Probe um die Bindungsstellen des spezifischen Antikörpers konkurriert. Die Dissertation von SIMON (1978) befaßt sich ausführlich mit diesem Test. Auf Grund der hohen Empfindlichkeit (siehe Übersicht 2) sind - ähnlich wie beim RIA - für den Enterotoxin-Nach-

weis in Lebensmitteln weniger Extraktionsschritte erforderlich als beim Gel-Diffusionstest. So führten SIMON und TERPLAN (1977) noch die gesamte von REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974) beschriebene Extraktion (s. Seite 8) durch. SIMON (1978) erwähnte jedoch, daß der Enterotoxinnachweis ohne weiteres auch in nur durch Säurefällung und Chloroformextraktion hergestellten Lebensmittelextrakten möglich sei. Ähnlich wie SIMON geht auch FEY (1978b) vor. SAUNDERS und BARTLETT (1977) dagegen stellten flüssige Lebensmittel bzw. mit NaCl gewonnene Lebensmittelextrakte nur auf pH 8,0 ein und versetzten sie mit geringen Mengen Tween 80.

Augenblicklich ist der ELISA-Test für den Enterotoxinnachweis noch nicht allgemein anwendbar. Reduzierte Strahlenbelastung, größere Stabilität der enzymmarkierten Substanzen, geringerer apparativer Aufwand, einfaches Handhaben und kürzerer Zeitaufwand sprechen jedoch dafür, daß der ELISA-Test bessere Aussichten als der RIA hat, einmal an die Stelle der Gel-Diffusionstests zu treten (ZAADHOF, 1978).

2.3 Ultrafiltration

Unter Ultrafiltration versteht man selektives Abtrennen von makromolekularen Stoffen (i.d.R. Stoffe mit Molekulargewichten >1000) aus Lösungen mittels semipermeabler Membranen. Im Prinzip unterscheidet sie sich von der normalen Filtration durch die Größenordnung der abzutrennenden Partikel (REUTER, 1975). Das Zurückhalten der Makromoleküle bei der Ultrafiltration beruht mit auf einem Siebeffekt. Lösungsmittel und gelöste Stoffe geringerer Molekülabmessung treten dagegen durch die als poröses Gebilde zu betrachtende Membran hindurch. Dabei ist die Durchflußrate umgekehrt proportional zur Viskosität der Lösung. Ständig reichern sich zurückgehaltene Stoffe an der Membranoberfläche an (Konzentrationspolarisation). Als Folge der Konzentrationsüberhöhung ist sogar ein Ausfällen einer der gelösten Komponenten an der Membranoberfläche möglich. Dieser Niederschlag aus

nicht-permeablen, durch Überschreiten der Löslichkeitsgrenze ausgefällten Stoffe, kann eine Gelschicht bilden. Diese wirkt dann wie eine Sekundärmembran und bietet einen zusätzlichen Widerstand für die nicht filtrierte Flüssigkeit. Der Widerstand der Gelschicht kann sogar ein Vielfaches des reinen Membranwiderstandes erreichen. Da die Konzentrationspolarisation primär ein Grenzschichtphänomen darstellt, ist sie in einfacher Weise durch Verbessern der Turbulenz zu beeinflussen. Besonders wichtig bei der Ultrafiltration ist die Membran. Bei den zur Zeit verfügbaren Ultrafiltrationsmembranen handelt es sich überwiegend um asymmetrische mit einer mikroporösen Struktur. Diese Membranen bestehen aus einer sehr dünnen, ca. 0,1 bis 0,25 µm starken "aktiven" Schicht mit einer Porengröße zwischen etwa 10 - 150 Å und einer großporigen, wesentlich dickeren Stützschicht. Auf der Membranoberfläche abgetrennte Moleküle können leicht wieder entfernt werden. Moleküle, die in die Membranmatrix gelangen, durchlaufen diese leicht, da sich die Poren der Membran nach unten erweitern. Als Materialien für Ultrafiltrationsmembranen werden Zellulosederivate und synthetische Polymere verwendet, die Entwicklung tendiert jedoch zu denen aus Kunststoffpolymeren. Membranen dieser Art zeichnen sich nämlich durch gute mechanische Festigkeit und Beständigkeit gegenüber chemischen und mikrobiellen Einflüssen aus. Auf diese Weise kann eine gleichbleibende Durchlässigkeit der Membran und eine lange Lebensdauer gewährleistet werden. Neben der Beständigkeit und damit wiederholten Verwendbarkeit sind auch scharfe Trenngrenze, hohe Durchflußrate und geringe Adsorptionsanfälligkeit wichtig. Eine scharfe Trenngrenze ist notwendig, um Moleküle einer gewissen Größe möglichst vollständig zurückzuhalten, alle kleineren aber hindurchtreten zu lassen. Die tatsächliche Trenngrenze einer Membran ist abhängig von Größe und Struktur der Moleküle. Die Angabe des Molekulargewichtes kann nur als Vergleichsstandard und zur allgemeinen Klassifizierung dienen. Um möglichst quantitatives Abtrennen zu erreichen, ist es daher meist günstiger, eine Membran auszuwählen, deren Trenngrenze deut-

lich unter der Größe der abzutrennenden Moleküle liegt (AMICON). Deswegen ist eine hohe Durchlässigkeit der Membran für das Lösungsmittel und damit hohe Filtrationsgeschwindigkeit bei möglichst geringem hydrostatischen Druck bedeutsam. Verschiedene Faktoren bestimmen die Durchflußrate. Die wichtigsten sind: Konzentration, Größe, Art und Diffusionsverhalten der Makromoleküle, Temperatur und Viskosität der Lösung sowie Membranfläche. Die Konzentrationspolarisation (AMICON) beeinträchtigt ebenfalls die Durchflußrate. Auf Grund der Adsorptionsanfälligkeit von einigen Ultrafiltrationsmembranen sind zu geringe Ausbeuten zu erwarten. Auch die Auswahl des Puffers kann einen Einfluß auf die unspezifische Adsorption an die Membran haben.

Die Ultrafiltration läßt sich verwenden zum Konzentrieren, Entsalzen (Diafiltrieren), Reinigen oder Fraktionieren makromolekularer Stoffe in Lösungen. Sie wird u.a. eingesetzt: Zum Aufarbeiten biologischer Substanzen (Enzyme, Hormone, Nukleinsäuren, Proteine, wie z.B. Enterotoxine); Vorbereiten klinischer Proben für die Analyse (Urin, Liquor, Serum oder Plasmafraktionen); Konzentrieren von Viren und Eluaten bei der Säulenchromatographie; Verbessern der konventionellen Dialyse, Elektrophorese und Immunelektrophorese; Isolieren von Spurenproteinen; Gewinnen von Stoffwechselprodukten; Abtrennen von Bakterien, Viren, Pyrogenen und Züchten von Zellkulturen (AMICON). Ferner spielt die Ultrafiltration in der Lebensmitteltechnologie eine wichtige Rolle (REUTER, 1975). Beispiele sind: Gewinnen hochwertiger Proteinkonzentrate für die menschliche Ernährung und Eindicken wäßriger Lösungen als Zwischenstufe eines Verarbeitungsprozesses - Reinigen wäßriger Lösungen von unerwünschten gelösten Komponenten. Die breiteste Anwendung innerhalb der Lebensmittelverarbeitung findet die Ultrafiltration jedoch zur Zeit in der Milchverarbeitung und hier wiederum beim Verarbeiten von Molke und Konzentrieren von Magermilch (REUTER, 1975).

3. Untersuchungen

Aufgrund des erheblichen Zeitaufwandes und der hohen Verlustraten bei den herkömmlichen Verfahren zum Extrahieren und Konzentrieren in Lebensmitteln vorhandener Enterotoxine (NISKANEN und LINDROTH, 1976; SINELL und MENTZ, 1978) sollte geprüft werden, ob die Ultrafiltration für diese Zwecke nicht besser geeignet ist. Dieses Verfahren bot sich um so mehr an, als es - wie bereits erwähnt - auf vielen anderen Gebieten mit Erfolg zum Konzentrieren, Entsalzen, Reinigen oder Fraktionieren makromolekularer gelöster Stoffe eingesetzt wird. Vor Durchführen der eigenen Hauptversuche mit enterotoxinhaltigen Lebensmitteln wurde in gemeinsamen Untersuchungen am Institut der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Wiedergewinnungsrate von gereinigtem Enterotoxin geprüft. Für alle Experimente wurde Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) verwendet. Es wird in erheblich größeren Mengen pro ml Medium synthetisiert als die anderen Enterotoxintypen und läßt sich zudem am leichtesten reinigen (BERGDOLL, 1972). Deshalb waren die für die Versuche erforderlichen Reagenzien (Antigen, Antikörper) auch in größeren Mengen noch vergleichsweise kostengünstig.

3.1 Orientierende Versuche zur Eignung der Ultrafiltration für das Konzentrieren von gereinigtem SEB

3.1.1 Material und Methodik

Bei dem verfügbaren SEB handelt es sich um am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch hergestellte Produkte unterschiedlichen Reinheitsgrades (SEB I mit ca. 20 %; SEB III mit ca. 90 %) sowie ein von der Firma Serva (Heidelberg) vertriebenes Produkt.

Für die Ultrafiltration wurden Zellen mit Magnetrührern eingesetzt. Verwendet wurden die Standardzellen 12, 52 bzw. 402 der Firma AMICON (Witten/Ruhr). Diese Zellen bestehen aus Bodenstück mit Membranträger und Auslaufstutzen, graduiertem Zylinder sowie Kopfstück

mit Rührer, Druckanschluß, Einfüllstutzen und Überdruckventil. Mit Hilfe eines Klemmverschlusses werden die Einzelteile zusammengehalten. Die von der zu filtrierenden Lösung berührten Teile bestehen aus inerten Kunststoffen. Über einige technische Daten dieser Zellen gibt Tabelle 1 Auskunft.

Tabelle 1: Technische Daten von AMICON-Standardzellen

	Modell		
	12	52	402
Max. Volumen (ml)	10	65	400
Durchmischbares Mindestvol. (ml)	1	2,5	10
Wirksame Membranfläche (cm^2)	3,6	12,5	39,2
Max. zulässiger Druck (psi)	75	75	75

Daraus geht hervor, daß beim Einsatz von Standardzellenmodellen u.a. das Ausgangsvolumen und das durch den Rührstab noch durchmischbare Mindestvolumen sehr unterschiedlich sind. Der dicht oberhalb des Membranträgers befindliche, magnetisch angetriebene Rührstab soll die im Schrifttum (Seite 18) bereits besprochene, die Trenngrenze und Durchflußleistung beeinflussende Konzentrationspolarisation herabsetzen bzw. verzögern. Als Membranen dienten DIAFLO-Ultrafiltrationsmembranen (AMICON) aus synthetischen Polymeren. Auf Grund ihrer asymmetrischen Struktur und völlig glatten Oberfläche haben DIAFLO-Membranen nach Angabe des Herstellers sehr hohe Durchflußraten und sind nur gering anfällig gegen Adsorptionen; außerdem lassen sie sich leicht und gut reinigen und etwa 10 - 20 mal wieder verwenden. Beim Auswählen der in verschiedenen Typen verfügbaren Membranen (z.B. UM, PM, XM, DM) sind insbesondere

Trenngrenze, Filtrationsvermögen wie auch Beständigkeit zu berücksichtigen. Um möglichst quantitatives Abtrennen zu erzielen, sollten - den Hinweisen der Hersteller folgend - nur Membranen genommen werden, deren Trenngrenze sich deutlich von der Größe der abzutrennenden Moleküle ($\hat{=}$ SEB) unterscheidet.

3.1.2 Versuchsdurchführung und Ergebnisse

In der ersten Versuchsreihe wurde die Eignung der in der Tabelle 2 aufgeführten DIAFLO-Membranen zum Abtrennen (XM 50) bzw. Konzentrieren von SEB geprüft. Die Membranen UM 10 und PM 10 wurden trotz gleicher nomineller Trenngrenzen in die Untersuchungen mit einbezogen, da die PM-Typen nämlich erheblich bessere Durchflußraten aufweisen und gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln und chemischen Stoffen beständiger sind. Andererseits soll bei den UM-Typen die Schärfe der Trenngrenze besser sein und nur eine äußerst geringe Adsorptionsneigung gegenüber Proteinen vorliegen. Als Ultrafiltrationsgeräte dienten die Standardzellen 12 bzw. 52. Die in fließendem Wasser gesäuberten und mit 70%igem Alkohol desinfizierten Einzelteile wurden nach Einlegen der DIAFLO-Membran zusammengesetzt. Diese mußte entsprechend den Angaben des Herstellers (Publikation I-101) gereinigt, mit 25%igem Alkohol desinfiziert und in 10%igem Alkohol bei Kühlschranktemperatur gelagert werden. (Neue Membranen muß man zum Reinigen und Entfernen von anhaftenden Glyzerinresten nur ca. 1 Std. lang in Aqua dest. einlegen - bei häufigem Wechsel desselben -, gebrauchte Membranen jedoch zuerst gründlich unter fließendem Wasser abspülen, 30 - 60 Minuten in 0,1%ige Trypsinlösung einlegen, sorgfältig wässern und anschließend in 2 m-NaCl-Lösung verbringen). In die zusammengesetzte, mit dem Klemmverschluß versehene Zelle kam dann die zu filtrierende SEB-Lösung. Diese wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (pH 6,6) aus in lyophilisierter Form vorhandenem SEB III bzw. kommerziell vertriebenem SEB (Serva) hergestellt, und zwar

Tabelle 2: Verwendete DIAFLO-Membranen und deren nominelle Trenngrenzen

Membran	nominelle Trenngrenze (Molekulargewicht)
XM 50	50 000
UM 10	10 000
PM 10	10 000
DM 5	5 000
UM 2	1 000

in Konzentrationen von 0,5 bis 10 mcg/ml. Nach Verbringen der Zelle auf einen ungeheizten Magnetrührer und Anschluß an eine Stickstoffflasche wurde filtriert. Der Druck betrug dabei maximal 25 psi (XM 50) bzw. 50 psi (andere Membrantypen). Anschließend an die Filtration erfolgte Testen des Retentates und Permeates auf ihren Gehalt an SEB (jeweils in dreifachem Ansatz), und zwar mit dem einfachen radialen Immunodiffusionstest (MANCINI, CARBONARA und HEREMANS, 1965). Dieser wurde in der modifizierten, am Lehrstuhl üblichen Form durchgeführt (Einzelheiten dazu bei SOMMERFELD und TERPLAN, 1975; HELBER, 1977; LOCHER, 1977). Anhand einer mit reinem SEB (Serva) erstellten Eichkurve ließen sich die aus den Präzipitationsdurchmessern ergebenden SEB-Konzentrationen in den Retentaten und Permeaten ermitteln. Sie wurden dann zu den ebenfalls mit dem MANCINI-Test bestimmten Ausgangskonzentrationen der entsprechenden Probe ins Verhältnis gesetzt. Bei jeder MANCINI-Platte lief die Referenztoxinprobe (1 mcg SEB/ml) als interner Standard mit. Dadurch konnten plattenbedingte Unterschiede beim Auswerten direkt berücksichtigt werden. Das Auswerten der Versuche zeigte, daß bei Anwenden der XM 50, die eine deutlich über dem Molekulargewicht von SEB liegende nominelle Trenngrenze aufweist, ca. 90 % der SEB-Ausgangsmenge

im Permeat enthalten waren. SEB war sogar zu 100 % rückgewinnbar, wenn man nach dem ersten Durchlauf nochmals 10 bzw. 50 ml physiologische Kochsalzlösung in die betreffende Ultrafiltrationszelle gab (Diafiltration) und erneut filtrierte. Dafür war allerdings ein erheblich höherer Zeitaufwand erforderlich. Das SEB-Rückhaltevermögen der UM 10 lag bei 75 - 80%. Mit der eine deutlich bessere Durchflußrate aufweisenden PM 10 ließen sich nur 30-40% erzielen. Auffällig war bei der PM 10, daß nur ein sehr geringer Anteil des nicht mehr im Retentat enthaltenen SEB im Permeat zu finden war. Der bei der Ultrafiltration mit der PM 10 auftretende SEB-Verlust war somit in erster Linie durch eine weitgehende Adsorption an die Membran bedingt. Die DM 5 eignete sich für das Konzentrieren von SEB noch weniger als die PM 10, obwohl auf Grund der niedrigeren nominellen Trenngrenze eigentlich mit einer besseren Ausbeute zu rechnen war. Die Rückgewinnungsrate betrug jedoch maximal nur 5%. Die Durchflußrate war dazu noch sehr gering. Die besten Ergebnisse ließen sich mit der UM 2 erzielen. Zwar hielt auch diese Membran das SEB nicht vollständig im Retentat zurück, doch waren es durchschnittlich 85 - 90%. Die restlichen 10 - 15% fanden sich z.T. im Permeat oder wurden von der Membran adsorbiert.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde geprüft, inwieweit die Ultrafiltration von SEB-Lösungen mit der UM 2 durch die Art des Lösungsmittels und seinen pH-Wert beeinflußt wird. Als SEB wurde wiederum von der Firma Serva (Heidelberg) vertriebenes reines SEB sowie im Lehrstuhllaboratorium hergestelltes hochgereinigtes SEB III eingesetzt, in ergänzenden Versuchen außerdem das weniger stark gereinigte SEB I (Reinheitsgrad ca. 20%). Die SEB-Präparationen wurden in Konzentrationen von 0,5 bis 10 mcg/ml in physiologischer Kochsalzlösung, Aqua dest. bzw. 0,02 m Barbitalpuffer gelöst. Phosphatpuffer wurden in diese Versuchsreihe nicht mit einbezogen, da die UM 2 nach Angaben des Herstellers gegenüber Phosphatpuffer (>0,05 m) nicht beständig ist. Als Ultrafiltrationsgeräte wurden wiederum die Modelle 12 (10 ml) und

52 (50 ml) gewählt, des weiteren das Modell 402 für Volumina von 100 bzw. 400 ml.

Tabelle 3: Rückgewinnungsraten von gereinigtem SEB in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und pH-Wert

Lösungsmittel	pH	Rückgewinnungsrate (%)	
		SEB III	SEB I
Phys. NaCl-Lösung	6,6	85 - 90	35 - 40
Aqua dest.	6,8	85 - 90	35 - 45
0,02 m Barbitalpuffer	6,8	90 - 95	70 - 75
0,02 m Barbitalpuffer	7,6	90 - 98	70 - 75

Der Tabelle 3 ist zu entnehmen, daß die Rückgewinnungsraten für SEB III bei Einsatz von 0,02 m Barbitalpuffer als Lösungsmittel mit mindestens 90 % besser waren als bei physiologischer Kochsalzlösung oder Aqua dest. Da das kommerziell vertriebene SEB-Produkt (Serva) entsprechende Resultate erzielte, wurde auf eine gesonderte tabellarische Wiedergabe dieser Werte verzichtet. Dem pH-Wert kommt in den geprüften Bereichen offensichtlich keine entscheidende Bedeutung zu. Beim weniger stark gereinigten SEB waren die Lösungsmittel-bedingten Unterschiede zwischen physiologischer Kochsalzlösung bzw. Aqua dest. einerseits und Barbitalpuffer andererseits erheblich größer. Die im Vergleich zum SEB III deutlich geringere Ausbeute beim SEB I ist vermutlich auf anwesende Begleitproteine und sonstige Stoffe zurückzuführen. Sie verursachen wahrscheinlich unspezifische Adsorptionen an die UM 2-Membran. Hierfür spricht auch, daß sich im Ultrafiltrat nur sehr geringe Mengen SEB nachweisen ließen.

Da beim SEB I außerdem die Durchflußrate deutlich herabgesetzt war, wurde in einer dritten Versuchsreihe versucht, die SEB-recovery und Durchflußrate durch enzymatischen Abbau der Begleitproteine zu ver-

bessern. Vom hierfür eingesetzten Trypsin ist aus der Literatur bekannt (BERGDOLL, SUGIYAMA und DACK, 1959; SCHANTZ et al., 1965; SPERO, WARREN und METZGER, 1973; HELBER, 1977), daß es die biologische und serologische Aktivität von SEB nicht beeinflußt. Abweichend von der zweiten Versuchsreihe wurde SEB I in 0,02 m Barbitalpuffer mit 1 % Trypsin (pH 7,6) gelöst und vor der Ultrafiltration 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die Ergebnisse zeigten nicht nur eine Steigerung der Durchflußrate, sondern auch eine wesentlich bessere SEB-recovery als bei den Versuchen ohne Trypsinzusatz. Die Rückgewinnungsrate belief sich nämlich auf 90-95 %. Sie lag damit in dem gleichen Bereich wie bei dem hochgereinigten SEB III bzw. dem kommerziell vertriebenen reinen SEB (Serva).

3.2. Versuche zur Eignung der Ultrafiltration zum Abtrennen und Konzentrieren aus Lebensmitteln extrahierten Enterotoxins

Diese Untersuchungen lassen sich in zwei Abschnitte einteilen: Modellversuche an künstlich mit SEB kontaminierten Lebensmitteln und Analysen von Nahrungsmitteln, bei denen es vermutlich infolge einer natürlichen Kontamination mit S. aureus zur Enterotoxinbildung gekommen war (nach Verzehr Auftreten von für Staphylokokken-Intoxikationen typischen Symptomen).

3.2.1. Material und Methodik

Bei den künstlich mit SEB kontaminierten Lebensmitteln handelte es sich um:

Pasteurisierte Trinkmilch mit 3,5 bzw. 1,5 % Fett;
Hackfleisch;
Wurst (Mettwurst, Regensburger, Stadtwurst, Salami, Lyoner)
sowie Käse (Emmentaler mit 45 % Fett i. Tr.).

An Enterotoxin waren SEB III institutseigener Produktion (ca. 90% rein)

bzw. das von der Firma Serva vertriebene Produkt verfügbar. Die den Lebensmitteln zugesetzten SEB-Mengen betrugen anfangs 20; 15; 10; 5; 2,5; 1,0 mcg; später nur noch 0,5; 0,25 bzw. 0,1 mcg/100 g.

Die im Rahmen der Lebensmittelvergiftungserscheinungen auf die Anwesenheit von Enterotoxinen untersuchten Lebensmittel waren: Gulasch (Sauce), Fisch bzw. Emmentaler-Schmelzkäse. Auf Grund von Literaturrecherchen, an unterschiedlich stark gereinigtem SEB bei der Ultrafiltration erzielten Ergebnissen (3.1.2) und in Vorversuchen an mit SEB versetzten Lebensmitteln registrierten Resultaten wurde beim Extrahieren, Abtrennen und Konzentrieren der Enterotoxine im allgemeinen folgendermaßen vorgegangen:

1. 100 g fester Lebensmittelprobe - sofern erforderlich zuvor grob zerkleinert - wurden in einem Liter-Becherglas 200 ml Aqua dest. zugesetzt. Daran schloß sich Homogenisieren unter Zuhilfenahme eines Ultra-Turrax an, und zwar für ca. fünf Minuten, zumindest aber solange bis ein homogener Brei vorlag. Dann wurde bei den Modellversuchen in Aqua dest. oder 0,37%iger Hirn-Herz-Bouillon gelöstes SEB in definierter Menge (s.o.) zugegeben und das Ganze noch auf einem Magnetrührer gut durchmischt (ca. fünf Minuten). Beim Untersuchen von Milch wurde abweichend von der beschriebenen Methodik auf das Extrahieren verzichtet und bei den Modellversuchen das Toxin der Milch direkt unter Umrühren (Magnetrührer) zugegeben.

2. Um in Fetttröpfchen bzw. Fettkügelchen möglicherweise eingeschlossene oder von diesen adsorbierte Enterotoxine freizusetzen und den Abbau der die Ultrafiltration sowie den Toxinnachweis störenden Fette und Lipoproteine zu ermöglichen, wurde anschließend Lipase (Pankreaslipase der Fa. Merck mit 130 FIP - U/ml) zugesetzt. Vorversuche hatten nämlich ergeben, daß mit Lipase eine bessere Enterotoxinrückgewinnungsrate zu erzielen war als bei der üblicherweise für diese Zwecke vorgenommenen Chloroformextrak-

tion. Außerdem konnte auf diese Art der Arbeitsaufwand vermindert werden. (Vor der Lipasezugabe wurde die Probe noch mit 5 n-NaOH auf pH 8,5 eingestellt, um optimale Bedingungen für das Enzym zu schaffen). Die Mengen betrugen abhängig vom Fettgehalt des Lebensmittels 100 mcg bis 1 000 mcg Lipase pro 100 g bzw. 100 ml Milch. Die auf 37°C erwärmte Probe wurde danach auf einem laufenden Magnetrührer in einem Trockenschrank der gleichen Temperatur exponiert, und zwar auf Grund der Vorversuche für insgesamt drei Stunden. Stellte sich zwischenzeitlich ein deutlicher pH-Abfall ein, wurde der pH-Wert mit 5 n-NaOH korrigiert.

3. Nach dreistündigem Einwirken der Lipase erfolgte ein Zusatz von Trypsin der Fa. Merck (siehe auch Seite 27). Die Endkonzentration betrug bei den Versuchen maximal 0,05 %. Der pH-Wert pendelte von 8,5 bis 7,5 und wurde bei Bedarf mit 5 n-NaOH nachgestellt.

4. Zwei Stunden nach dem Trypsinzusatz wurden die Proben aus dem Trockenschrank genommen und mit 4 n-HCl auf pH 4,5 eingestellt, um den Enterotoxinnachweis störende Lebensmittelbestandteile auszufällen. Zum Trennen der festen von der flüssigen - enterotoxinhaltigen - Phase diente ein Kühlzentrifuge (Christ; Zeta 20). Sie lief 20 Min. bei 15 000 Umdrehungen/Minute meist mit acht, jeweils 90 ml fassenden Bechern, in welche die Proben gleichmäßig verteilt wurden. Der Überstand wurde dann durch ein Faltenfilter filtriert, um grobdisperse Bestandteile zurückzuhalten. Der Bodensatz kam abermals in ein Becherglas, um mit ca. 100 ml Aqua dest. bei laufendem Magnetrührer für ca. 30 Minuten aufgeschlämmt zu werden. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 4,5 erfolgte erneut Zentrifugieren und Filtrieren in der oben beschriebenen Weise. Nach dem Zusammengießen beider Filtrate wurde der pH-Wert mit 5 n-NaOH auf pH 7,6 verschoben und durch

10 ml 0,02 m Barbitalpuffer (pH 7,6) abgepuffert. Sofern die Filtrate sich eintrübten, war erneut zu zentrifugieren. Die anschließende Zugabe von Na-azid (Endkonzentration 0,01 %) verhinderte das Wachstum von Mikroorganismen.

5. Zum Ultrafiltrieren wurde der Extrakt in eine Amicon-Ultrafiltrationsanlage gegeben (Modell 402), die mit einer XM 50-Membran ausgerüstet war. Ihrer Filtercharakteristik entsprechend hält sie - wie bereits erwähnt - Stoffe mit einem Molekulargewicht von über 50 000 zurück. Nach Verbringen der Zelle auf einen ungeheizten Magnetrührer und Anschluß an eine Stickstoffflasche wurde mit maximal 25 psi filtriert. Die Durchflußrate betrug ca. 50 ml/Std. War die Probe bis auf einen Rest von ca. 10 ml durchgelaufen, wurden 10 - 20 ml Aqua dest. hinzugegeben und erneut filtriert (Diafiltration). Das gesamte Permeat (Ultrafiltrat) diente dann für die weiteren Analysenschritte, das Retentat wurde verworfen.

6. Das Ultrafiltrat der XM 50 wurde dann in eine andere Ultrafiltrationszelle (Modell 402) gegossen, die anfänglich mit einer UM 10-Membran versehen war, später mit einer UM 2. (Vergleichende Untersuchungen ergaben nämlich, daß das Ultrafiltrat bei der UM 10 - ähnlich wie bei reinem SEB (S. 25) - erhebliche Mengen an SEB enthielt, obwohl die UM 10 im allgemeinen Stoffe mit einem Molekulargewicht von über 10 000 zurückhält). Die beschickte Ultrafiltrationsanlage kam dann erneut auf einen ungeheizten Magnetrührer. Die Filtration erfolgte bis zu einem maximalen Druck von 50 psi. Die Durchflußrate lag dabei im Mittel bei 15 ml/Std.

7. Betrug der Inhalt der Ultrafiltrationszelle nur noch ca. 10 ml, wurde die Ultrafiltration abgebrochen, die Flüssigkeit vorsichtig abpipettiert und in eine kleinere, ebenfalls mit einer UM 2 (anfänglich UM 10) ausgerüstete Zelle (Modell 52 oder Modell 12) verbracht. Die Ultrafiltration lief auf der kleineren Membran weiter, bis nur noch ein Rest von ca. 1 ml (Modell 52) oder ca. 0,5 ml

(Modell 12) vorhanden war. (Durchflußrate ca. 5 ml beim Modell 52 bzw. 1 ml beim Modell 12).

8. Das mit Pasteurpipette und aufgesetztem Gummibällchen abgesaugte Konzentrat wurde zuerst für den Enterotoxinnachweis (s. 9.) herangezogen und anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage weiterkonzentriert. Für den Enterotoxinnachweis war Lösen des Lyophilisates notwendig. Hierzu dienten 250 mcl bzw. 500 mcl einer 1%igen wäßrigen Trypsinlösung.

9. Der Enterotoxinnachweis (bei den künstlich kontaminierten Lebensmittelproben nur Typ B, bei den anderen Lebensmitteln wie auch den Kontrollen Typen A, B, C_1, D und E) erfolgte mittels radialer Doppeldiffusion (Objektträgertest nach WADSWORTH (1957) bzw. nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975)) sowie Gegenstromelektrophorese (Screening-Test) und bei den mit SEB kontaminierten Proben auch mittels der einfachen radialen Immunodiffusion (MANCINI, CARBONARA und HEREMANS, 1965) und Elektroimmunodiffusion nach LAURELL (1972).

RADIALE DOPPELDIFFUSION

Diese Verfahren beruhen darauf, daß Antigen und Antikörper von ihrem jeweiligen Auftragsort aus radiär in ein Gel diffundieren und innerhalb entsprechender Reaktionszeit Antigen-Antikörper-Komplexe bilden, die als Präzipitationslinien sichtbar werden. Beim Verfahren nach WADSWORTH (1957) werden die zu untersuchenden Proben in eine auf die Agargelschicht gelegte, mit Löchern ausgestattete Schablone pipettiert. Beim Verfahren nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975) werden Löcher direkt in die Agargelschicht gestanzt. Einzelheiten lassen sich den Arbeiten von KUHNT (1974) sowie SOMMERFELD und TERPLAN (1975) entnehmen. Abweichend von den Angaben dieser Autoren wurden bei den eigenen Untersuchungen die Gele auch bei der WADS-

WORTH-Methode mit Coomassie brillant blau (Serva) gefärbt. Nachgewiesen werden konnten 0,3 mcg SEB/ml (Verfahren nach SOMMERFELD und TERPLAN) bzw. 0,1 mcg/ml (Verfahren nach WADSWORTH).

GEGENSTROMELEKTROPHORESE

Dieses Verfahren nützt das anodische Wandern der Antikörper. Die Präzipitationsbildung mit dem Antigen wird damit beschleunigt. Zum Bestimmen der immunologischen Identität von Enterotoxinen ist dieser Weg nur bedingt geeignet. Er bietet sich aber wegen des kurzen Zeitaufwandes für orientierende Schnellbestimmungen von Toxinen in Lebensmittelproben an (SOMMERFELD und TERPLAN, 1975). Die Gegenstromelektrophorese wurde in der von den letztgenannten Autoren beschriebenen Form durchgeführt (Empfindlichkeit: 0,1 mcg/ml). Hinsichtlich der Einzelheiten wird auf deren Publikation verwiesen.

EINFACHE RADIALE IMMUNODIFFUSION

Die einfache radiale Immunodiffusion (MANCINI, CARBONARA und HEREMANS, 1965) wurde bei einigen der mit SEB kontaminierten Lebensmitteln zusätzlich angewendet, um quantitative Aussagen zu erhalten. (Einzelheiten dazu bei SOMMERFELD und TERPLAN, 1975; HELBER, 1977; LOCHER, 1977). Die Nachweisgrenze lag bei 0,25 mcg/ml.

ELEKTROIMMUNODIFFUSION

Bei einem Teil der Analysen lief außerdem auch die Elektroimmunodiffusion (LAURELL, 1972) mit, und zwar in der von SOMMERFELD und TERPLAN (1975) beschriebenen Modifikation für SEB. (Auf Grund der ausführlichen Darstellung in diesen Publikationen kann hinsichtlich der Einzelheiten hierauf verwiesen werden). Nachweisen ließen sich auf diese Weise noch 0,25 mcg SEB/ml.

3.2.2. Ergebnisse

Vor den Hauptversuchen, bei denen alle im Abschnitt 3.2.1 geschilderten Schritte angewendet wurden, erwiesen sich mehrere Vorversuche als erforderlich. Sie sollten optimale Bedingungen ermitteln. Dies betraf in erster Linie den Einsatz von Lipase und Trypsin sowie die Ultrafiltration. Dabei ergab sich, daß sich durch Verlängern der Lipaseeinwirkungszeit über drei Std. hinaus keine bessere Lipolyse erzielen ließ. Die sich an den Fettabbau anschließende Proteolyse mußte auf zwei Std. beschränkt werden. Sonst war eine teilweise SEB-Inaktivierung (nach 3 Std. z.B. 20%) nicht mit Sicherheit auszuschließen. Außerdem zeigte sich, daß die beiden Enzyme nicht zur gleichen Zeit einwirken konnten, da das Trypsin in den angegebenen Konzentrationen die Lipaseaktivität nachteilig beeinflußte. Auf Grund dieser Feststellungen wurde dann dem Lebensmittelextrakt bei den eigentlichen Hauptversuchen die Lipase drei Std. vor dem Trypsin zugesetzt und die Proteolyse nach zwei weiteren Stunden durch Ansäuern auf pH 4,5 inhibiert.

Die Vorversuche erbrachten auch, daß für das Abtrennen der Enterotoxine von löslichen makromolekularen Lebensmittelbestandteilen (mit Molekulargewichten von über 50 000) die XM 50-Membran gut geeignet war. Zum Konzentrieren des Permeates der XM 50 wurde in den Vorversuchen im Hinblick auf den geringeren Zeitaufwand und die angegebene Filtercharakteristik nur die UM 10 eingesetzt. Die Durchflußrate der UM 10 ist nämlich erheblich größer als die der UM 2 (AMICON). Der SEB-Nachweis (Ausgangskonzentration 10 mcg/100 g) mittels radialer Doppeldiffusion war dabei eindeutig positiv.

In den ersten Hauptversuchen (Kontamination von Milch, Wurst bzw. Käse mit 20, 15, 10, 5 bzw. 2,5 mcg/100 g) wurde ebenfalls die UM 10 zum Konzentrieren von SEB angewendet. In allen Proben ließ sich im Retentat (Ultrafiltrationszelle Modell 52 bzw. 12) SEB sowohl mit den qualitativen (Gegenstromelektrophorese, radiale

Doppeldiffusion) als auch quantitativen Verfahren (einfache radiale Immunodiffusion, Elektroimmunodiffusion) nachweisen (Tabelle 4). Die Rückgewinnungsrate (gemittelter Wert der Ergebnisse in der einfachen radialen Immunodiffusion und Elektroimmunodiffusion) lag bei 15 % (Zusatz von 20 mcg SEB/100 g) bis 25 % (2,5 mcg SEB/100 g). In den zur Kontrolle mitlaufenden Blindproben erbrachte der Objektträgertest (WADSWORTH-Verfahren) in zwei Fällen positive Reaktion.

Tabelle 4: Nachweis von SEB in Lebensmittelextrakten bei Anwenden der Ultrafiltration zum Abtrennen (XM 50-Membran) und Konzentrieren (UM 10-Membran) des SEB

Lebensmittel	Zugesetzte SEB-Mengen/100 g bzw. 100 ml Milch	RIO[x)]	OUCHTERLONY[x)]	MANCINI[x)]	LAURELL[x)]
Milch	5 mcg	+	+	+	+
	2,5 "	+	+	+	+
Wurst[xx)]	20,0 mcg	+	+	+	+
	15,0 "	+	+	+	+
	10,0 "	+	+	+	+
	5,0 "	+	+	+	+
	2,5 "	+	+	+	+
Emmentaler	20,0 mcg	+	+	+	+
	10,0 "	+	+	+	+
	5,0 "	+	+	+	+
	2,5 "	+	+	+	+

x) RIO = Gegenstromelektrophorese; OUCHTERLONY = Objektträgertest nach WADSWORTH bzw. SOMMERFELD und TERPLAN; MANCINI = einfache radiale Immunodiffusion; LAURELL = Elektroimmunodiffusion.

xx) Salami, Stadtwurst, Leberkäse bzw. Regensburger.

Auch bei den sich anschließenden Versuchen mit 1 mcg SEB/100 g Nahrungsmittel konnte SEB mit den erwähnten Nachweisverfahren - von vereinzelten Ausnahmen abgesehen - im Retentat der UM 10-Membran gefunden werden. Wegen der in den Versuchen mit gereinigtem SEB beobachteten, relativ starken Durchlässigkeit dieser Membran für SEB wurde das Permeat der UM 10 anschließend noch mit Hilfe einer UM 2 eingeengt. Dieses Konzentrat war nach Gefriertrocknen und Rekonstituieren in Trypsinlösung des öfteren positiv. 0,5 mcg SEB/100 g Nahrungsmittel brachten beim Untersuchen der Retentate der UM 10 nur dann noch positive Ergebnisse, wenn sie durch Lyophilisieren weiter konzentriert worden waren. (Bei Stadtwurst verlief der Nachweis allerdings auch in diesem Fall negativ. Nur im gemeinsamen Lyophilisat aus dem Retentat der UM 10 und aus dem auf der UM 2 konzentrierten Permeat der UM 10 war SEB vorhanden). Um Membranen zu sparen, wurden darauf nur noch die XM 50 und die UM 2 (statt der UM 10 und UM 2) verwendet (Tabelle 5). Während bei Lebensmitteln, die 0,5 mcg SEB pro 100 g enthielten, das Retentat der UM 2 für einen positiven Nachweis durchwegs nicht lyophilisiert werden mußte, war dies bei den geringeren SEB-Konzentrationen (0,25 mcg bzw. 0,1 mcg/100 g) unerläßlich. In zwei von zehn Proben mit 0,1 mcg SEB/100 g war allerdings auch dann kein positives Ergebnis zu registrieren. Im übrigen gelang der sichere SEB-Nachweis bei den drei letztgenannten Konzentrationen nur noch mit dem Objektträgertest nach WADSWORTH (die Ergebnisse der Gegenstromelektrophorese waren bei 0,1 mcg/100 g nicht immer eindeutig). In den zur Kontrolle mitlaufenden Blindproben ließ sich mit einer Ausnahme kein Enterotoxin finden.

Beim Untersuchen der verdächtigen Lebensmittelproben wurden mit Gegenstromelektrophorese und OUCHTERLONY-Test Enterotoxine im Gulasch (Sauce) und Fisch registriert. Dabei handelte es sich entsprechend den Ergebnissen des OUCHTERLONY-Testes um die Typen A, B, D und E (Gulasch-Saucengemisch von mehreren Por-

Tabelle 5: Nachweis von SEB in Lebensmittelextrakten bei Anwenden der Ultrafiltration zum Abtrennen (XM 50-Membran) und Konzentrieren (UM 2-Membran) des SEB

Lebensmittel	Zugesetzte SEB-Mengen/100 g bzw. 100 ml Milch	RIO[x)]	OUCHTERLONY[x)]
Milch	0,5 mcg	+	+
	0,25 "	+	+
	0,10 "	(+)	+
Wurst[xx)]	0,50 mcg	+	+
	0,25 "	+	+
	0,10 "	(+)	+
Käse (Emmentaler)	0,50 mcg	+	+
	0,25 "	+	+
	0,10 "	(+)	+

x) RIO = Gegenstromelektrophorese; OUCHTERLONY = Objektträgertest nach WADSWORTH.

xx) Stadtwurst, Lyoner, Mettwurst.

tionen) bzw. B und D (Fisch). Im Emmentaler-Schmelzkäse gelang demgegenüber kein positiver Enterotoxin-Nachweis. Parallel zu den eigenen Untersuchungen wurde am Institut bei diesen Lebensmitteln auch die von REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974) empfohlene Methode angewandt. Die hierbei erzielten Ergebnisse stimmten mit den eigenen überein. Die jeweils mitlaufenden Blindproben (vergleichbare Lebensmittel) waren negativ.

Abschließend bleibt festzuhalten, daß sich für den Enterotoxin-Nachweis in Lebensmitteln bei Anwenden der Ultrafiltration in der unter

3.2.1 beschriebenen Art folgender Zeitaufwand ergab:

Bis zum Konzentrieren des Lebensmittelextraktes mit der XM 50:	7 Stunden
Abtrennen der Enterotoxine von höhermolekularen Stoffen mit der XM 50:	6 Stunden
Konzentration der Enterotoxine mit der UM 2:	22 Stunden
Lyophilisieren:	18 Stunden
Ouchterlony:	24 Stunden

4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Ausländischen Statistiken über die Häufigkeit der verschiedenen bakteriell bedingten Lebensmittelvergiftungen läßt sich entnehmen, daß Staphylokokken-Intoxikationen im allgemeinen an erster oder zweiter Stelle (nach Salmonella-Infektionen) stehen. So gibt das CENTER FOR DISEASE CONTROL (1977) an, daß 1976 in den USA bei 35,7 % der von einer bakteriellen Lebensmittelvergiftung betroffenen Personen Salmonellen die Ursache waren, bei 28,4 % dagegen S. aureus. Im Jahr zuvor erwähnte die gleiche Statistik S. aureus mit 45,2 % erheblich häufiger als auslösendes Agens als Salmonellen mit 31,3 %. Der im folgenden wiedergegebenen Übersicht von TODD (1978) läßt sich entnehmen, daß zwar von Land zu Land beträchtliche Unterschiede bestehen können, die wichtige Rolle von S. aureus aber nie unterschätzt werden darf. Für die Bundesrepublik existieren keine vergleichbaren Angaben. Es ist jedoch anzunehmen, daß auch hier durch S. aureus bedingte Lebensmittelvergiftungen relativ häufig sind - ohne allerdings immer erkannt zu werden. Die von einigen S. aureus-Stämmen gebildeten Enterotoxine rufen diese Intoxikationen hervor. Die krankmachende Dosis ist u.a. von der Empfindlichkeit des Individuums und der Art des toxinhaltigen Lebensmittels abhängig. Mengen von weniger als 0,1 mcg sollen jedoch schon reichen, um die typischen Symptome einer Staphylokokken-Intoxikation zu bewirken (BERGDOLL,

Übersicht 4: Häufigkeit verschiedener bakteriell bedingter Lebensmittelvergiftungen in sechs Ländern

Keime	Anteil an Lebensmittelvergiftungen (%) in				
	Canada 1973/75	USA 1973/75	England 1973/75	Japan 1968/72	Australien 1967/71
Clostridium perfringens	11,1	12,7	7,7	--	33,3
Salmonella spp.	29,2	33,5	86,6	12,8	27,3
S. aureus	40,2	33,9	2,6	27,6	27,3
V. parahaemolyticus	0,5	1,0	0,3	52,2	3,0
Sonstige	19,0	18,9	2,8	7,4	9,1

1978). Deshalb sind zum Nachweis der Enterotoxine äußerst empfindliche Verfahren notwendig.

Von den vielen in der Literatur beschriebenen biologischen Methoden hat sich nur der Affenfütterungstest als zuverlässig erwiesen (Literatur bei GANTZE, 1976). Affen werden wegen der nicht unerheblichen Anschaffungs- und Haltungskosten sowie aus tierschützerischen Aspekten für Routineuntersuchungen jedoch kaum mehr eingesetzt. Außerdem reagieren Affen weniger empfindlich gegenüber Enterotoxin als der Mensch. Heute behaupten für diese Zwecke durchwegs serologische Nachweismethoden das Feld. Unter diesen sind die Gel-Diffusionstests als die klassischen Analysen anzusehen. Sie können jedoch nicht zum unmittelbaren Nachweis der Enterotoxine in Lebensmitteln eingesetzt werden. Zum einen ist die Empfindlichkeit dieser Verfahren (ca. 0,1 mcg/ml) nicht groß genug, da die im allgemeinen verzehrten Mengen eines Lebensmittels durchwegs größer als 1 ml (oder g) sind. Zum anderen können im Lebensmittel enthaltene Substanzen eine positive Reaktion überdecken oder eine falsch-positive bewirken. Es sind daher verschiedene Methoden erarbeitet wor-

den, um die Enterotoxine vor dem eigentlichen Nachweis aus dem Lebensmittel zu extrahieren, von festen und löslichen Lebensmittelbestandteilen abzutrennen und zu konzentrieren.

Diese Methoden beruhen im allgemeinen auf chromatographischen Prozessen (zum Abtrennen der Enterotoxine) sowie chemischen bzw. physikalischen Prinzipien (zum Entfernen der den Enterotoxinnachweis störenden Lebensmittelbestandteile). Es ist verständlich, daß bei diesen Eingriffen Enterotoxin verlorengeht. Dabei sind bei Anwenden von Carboxymethylcellulose und durch Erhitzen relativ hohe Verluste zu registrieren (s. Übersicht 5). Nach SINELL und MENTZ (1978) liegen die Toxinverluste bei säulenchromatographischer Reinigung der Extrakte sogar in der Größenordnung von 90 %. Demgegenüber soll nach Angabe dieser Autoren die Säurefällung keine Toxinverluste verursachen.

Übersicht 5: Einfluß verschiedener Prozesse auf die Wiedergewinnungsrate von in Lebensmitteln enthaltenem radiomarkierten SEA (nach NISKANEN und LINDROTH, 1976)

Prozeß	Durchschnittliche Wiedergewinnungsrate (%)
Chloroformextraktion	68,7
Säurefällung (4,5)	73,8
Chromatographie mittels Ionenaustauscher	
CM 22	35,0
Amberlite CG 50	46,6
Gelfiltration	
Sephadex G 25	62,8
Biogel P 60	59,3
Erhitzen (56°C)	34,6
Konzentration gegenüber	
Carbowax	74,5

Trotz der erheblichen Toxinverluste während des Extrahierens, Abtrennens und Konzentrierens der Enterotoxine gelingt es mit dem von CASMAN (1967) beschriebenen Verfahren (einschließlich der Modifikationen), geringste Mengen an Enterotoxin nachzuweisen. (Nach BENNETT et al. (1973) noch 0,06 mcg/100 g Lebensmittel). Mit der von REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974) entwickelten Methode sind noch Mengen von 0,125 mcg Enterotoxin/100 g zu finden. Infolgedessen darf man davon ausgehen, daß bei negativem Ergebnis in einem der beiden Verfahren die Anwesenheit von Enterotoxinen in krankmachender Dosis ausgeschlossen werden kann. Bei allen anderen bisher für diese Zwecke beschriebenen Verfahren (s. 2.2.1) trifft dies - möglicherweise mit Ausnahme der Methode von NISKANEN und LINDROTH (1977) - nicht zu.

Ein gewisses Handicap fast aller in der Literatur beschriebenen Verfahren zum Extrahieren, Abtrennen und Konzentrieren der Enterotoxine ist der nicht unerhebliche Material- und Zeitaufwand. Letzterer beträgt z.B. bei dem Verfahren von CASMAN ca. 3 - 5 Tage (abhängig von der Art des zu untersuchenden Lebensmittels) bzw. bei der Methode von REISER, CONAWAY und BERGDOLL ca. 2 - 3 Tage (ZAADHOF, 1978).

Im Hinblick auf den Zeitaufwand und die erheblichen Toxinverluste bei den herkömmlichen Methoden sollte daher geprüft werden, ob

1. die chromatographische Reinigung bzw.
2. das Konzentrieren der Lebensmittelextrakte gegen Carbowax oder mittels Gefriertrocknen nicht durch die Ultrafiltration ersetzt werden können.

Da bei Beginn der eigenen Untersuchungen (1974) keine Erfahrungen mit der Ultrafiltration von Enterotoxin vorlagen, wurde zuerst in gemeinsamen Untersuchungen am Institut ihre Eignung für Abtrennen und Konzentrieren von gereinigtem SEB getestet. Für die Modellversuche kamen Ultrafiltrationszellen der Firma Amicon mit dazu passenden, aus

synthetischen Polymeren hergestellten DIAFLO-Ultrafiltrationsmembranen zum Einsatz. Die ersten Versuche ergaben, daß die XM 50-Membran (Filtercharakteristik: MG 50 000), deren Trenngrenze beträchtlich höher liegt als das Molekulargewicht von SEB (ca. 30 000), ungefähr 90 % des gelösten SEB durchließ. Wurde anschließend dem in der Ultrafiltrationszelle befindlichen Rückstand etwas Flüssigkeit zugegeben und erneut filtriert (Diafiltration), ließ sich das gesamte SEB im Permeat nachweisen. Deshalb darf man davon ausgehen, daß die XM 50-Membran sehr gut geeignet ist zum Abtrennen von SEB bzw. anderen Enterotoxintypen von höhermolekularen Stoffen (Molekulargewicht $>$ 50 000) wie sie z.B. in Lebensmittelextrakten zu erwarten sind.

Zum Einengen des mit der XM 50 abgetrennten SEB dienten verschiedene Membranen mit nominellen Trenngrenzen von maximal 10 000 (Molekulargewicht). Auf Membranen mit einer höheren nominellen Trenngrenze (z.B. UM 20; Molekulargewicht 20 000) wurde verzichtet. Nach Empfehlungen des Membranherstellers sollten nämlich für quantitatives Abtrennen nur Membranen benutzt werden, deren nominelle Trenngrenze sich deutlich von der Größe der abzutrennenden Moleküle - hier SEB - unterscheidet. Bei diesen Experimenten stellte sich dann heraus, daß UM 2-Membranen (nominelle Trenngrenze: 1000) eine bessere recovery des in physiologischer NaCl gelösten SEB ermöglichten (ca. 85 - 90 %) als UM 10- bzw. PM 10-Membranen mit einer nominellen Trenngrenze von 10 000 (Wiedergewinnungsrate max. 80 %). Diese Unterschiede sind - wie durch vergleichende Untersuchungen der Permeate bestätigt werden konnte - in erster Linie darauf zurückzuführen, daß die UM 2 für SEB wesentlich weniger durchlässig war. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit denen anderer Autoren ist nicht möglich, da entsprechende, Staphylokokken-Enterotoxine betreffende Angaben in der Literatur nicht gefunden werden konnten. Einer Information der Firma AMICON läßt sich jedoch entnehmen, daß α-Chymotrypsinogen, welches mit 24 500 ein ähnliches Molekulargewicht

aufweist wie SEB, durch die UM 2 besser abgetrennt wird als durch die UM 10 oder PM 10. Auffällig waren im übrigen die erheblichen Unterschiede der Wiedergewinnungsrate mit der UM 10 (ca. 75 - 80 %) bzw. PM 10 (ca. 30 - 40 %). Diese waren offensichtlich durch Adsorption des SEB an die PM 10 bedingt. In den Permeaten der beiden Membranen waren nämlich keine signifikanten Differenzen hinsichtlich des Toxingehaltes zu registrieren. Diese Ergebnisse stehen in einem gewissen Widerspruch zu den Daten von GASPER (1973). Ihm gelang mit der PM 10 bei in physiologischer NaCl gelöstem Staphylokokken-Enterotoxin A ein 100 %iges Wiedergewinnen. Möglicherweise sind diese Unterschiede jedoch darauf zurückzuführen, daß es sich bei den verwendeten Staphylokokken-Enterotoxinen um unterschiedliche Typen handelte. Aufgrund der besseren recovery wurde für einige weitere Versuchsanalysen an gereinigtem bzw. teilweise gereinigtem SEB nur die UM 2 eingesetzt. Hierbei konnte entdeckt werden, daß das Rückgewinnen von SEB durch das Lösungsmittel beeinflußt wird. Das in Barbitalpuffer gelöste SEB hatte z.B. eine deutlich höhere recovery (maximal 98 %) als das gleiche in physiologischer NaCl gelöste Produkt. Bei teilweise gereinigtem SEB war eine derartig hohe Rate an wiedergefundenem Toxin aber nur zu erzielen, wenn die SEB-Lösung zuvor mit Trypsin inkubiert worden war. Bei diesem Prozeß baut das Trypsin Begleitproteine weitgehend ab (REISER, CONAWAY und BERGDOLL, 1974; BERGDOLL, REISER und SPITZ, 1976). Die bei ungereinigtem Enterotoxin häufigen unspezifischen Adsorptionen der Enterotoxin-Begleitprotein-Komplexe an die UM 2 verlieren somit erheblich an Gewicht. Das Enterotoxin selbst wird durch das Trypsin - wie aufgrund der Angaben von BERGDOLL, SUGIYAMA und DACK (1959), SCHANTZ et al. (1965), SPERO, WARREN und METZGER (1973); HELBER (1977) sowie SINELL und MENTZ (1978) zu erwarten war - offensichtlich nicht angegriffen.

Mit den bei den orientierenden Untersuchungen an gereinigtem SEB ge-

wonnenen Resultaten war bereits eine Basis für die Ultrafiltration mit SEB kontaminierter Lebensmittelextrakte gegeben. Auf Grund der in zusätzlichen Vorversuchen mit Lebensmitteln erzielten Daten wurde dann das im folgenden kurz wiedergegebene Verfahren in den Hauptversuchen angewandt. Angelehnt an die Methodik anderer Autoren wurden mit Aqua dest. aus festen Lebensmitteln (Wurst, Käse) die löslichen Bestandteile extrahiert (incl. SEB). Die Lebensmittel bzw. die mit SEB kontaminierte Milch wurden dann einer Lipase- und Trypsinbehandlung unterzogen. Der Einsatz von Lipase zum Abbau der die Ultrafiltration und den eigentlichen Toxin-Nachweis störenden Fette ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Die für das Entfernen der Fette und Lipoproteine von anderen Autoren durchgeführte Chloroformextraktion erbrachte jedoch stets eine schlechtere SEB-Ausbeute als der enzymatische Abbau mit Lipase. Auch NISKANEN und LINDROTH (1976) sowie SINELL und MENTZ (1978) beobachteten beträchtliche SEB-Verluste nach $CHCl_3$-Extraktion, die offensichtlich durch teilweises Ausfallen mit anderen Substanzen bedingt sind. Beim Einsatz von Lipase dagegen werden möglicherweise auch in Fetttröpfchen oder Fettkügelchen eingeschlossene oder von diesen adsorbierte Enterotoxine freigesetzt. Diese Theorie läßt sich allerdings bei den künstlich mit SEB kontaminierten Lebensmitteln nicht beweisen. Im Gegensatz zum hier erstmalig beschriebenen Einsatz von Lipase war die anschließende Trypsinbehandlung der Lebensmittelextrakte bereits von REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974) erwähnt worden. Später beschrieben sie außerdem noch NISKANEN und LINDROTH (1977) sowie SINELL und MENTZ (1978). Für das Benutzen des Trypsins zum Abbau von Begleitproteinen sprach auch der - bereits erwähnte - positive Effekt bei der Ultrafiltration des nur teilweise gereinigten SEB. Diese Proteolyse mußte allerdings auf zwei Stunden beschränkt werden, da sich sonst eine teilweise SEB-Inaktivierung nicht ausschließen ließ. Ein gleichzeitiger Zusatz von Lipase und Trypsin war nicht möglich, da die Aktivität des fettabbauenden Enzyms vom Trypsin nachteilig be-

einflußt wurde. Nach dem Exponieren gegenüber Trypsin wurde noch eine Säurefällung vorgenommen (pH 4,5). Hierbei war zwar ein Toxinverlust nicht zu vermeiden - dies beobachteten auch NISKANEN und LINDROTH (1976), nicht aber SINELL und MENTZ (1978) -, doch war ohne diesen Schritt die spätere Ultrafiltration auf der XM 50 häufig erheblich verzögert (Konzentrationspolarisation). Der dann beim Zentrifugieren gewonnene Überstand wurde schließlich noch unter Berücksichtigen der an gereinigtem SEB registrierten Ergebnisse auf pH 7,6 eingestellt und mit 0,02 m Barbitalpuffer abgepuffert. Das Abtrennen der Enterotoxine von höhermolekularen Substanzen erfolgte in der bereits für gereinigtes SEB beschriebenen Art mit der XM 50. Dabei waren die Enterotoxine im allgemeinen ohne signifikante Konzentrationsverluste im Permeat nachweisbar. Das Permeat wurde dann bei den ersten Experimenten gegenüber der UM 10 eingeengt. Zwar hatte sich bei den Versuchen mit gereinigtem SEB gezeigt, daß die UM 2 eine bessere recovery als die UM 10 erlaubte, doch war der Zeitaufwand für die Ultrafiltration etwa fünfmal so groß. Nachdem entsprechend der gestellten Aufgabe auch dem Faktor Zeit eine gewichtige Rolle beizumessen war, wurde anfänglich die zeitsparende UM 10 eingesetzt. Auf diese Weise ließen sich in Lebensmittelproben noch 2,5 mcg SEB pro 100 g mit den verwendeten Enterotoxinnachweisverfahren (Gegenstromelektrophorese, radiale Doppeldiffusion) sicher erfassen. Proben mit 1,0 mcg SEB/100 g Lebensmittel erbrachten bereits vereinzelt negative Resultate, während Proben mit 0,5 mcg/100 g nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Selbst bei Gebrauch der für SEB weniger durchlässigen UM 2-Membran (anstelle der UM 10) war das Retentat von Lebensmittelproben mit 0,5 mcg SEB/100 g in Ausnahmefällen negativ. Um diese Konzentrationen wie auch Mengen von 0,25 mcg/100 g mit Sicherheit nachweisen zu können, war zusätzlich noch ein Lyophilisieren des Retentates der UM 2-Membran erforderlich. Unter diesen Voraussetzungen ließ sich auch in acht von zehn Proben mit SEB-Konzentrationen von 0,1 mcg/100 g (oder 100 ml) Nah-

rungsmittel ein positiver Nachweis mit der radialen Doppeldiffusion (modifizierte WADSWORTH-Technik) führen. Inwieweit Entsprechendes auch für die anderen Enterotoxintypen zutrifft, konnte nicht eingehend geprüft werden. Zwar wurden bei an Lebensmittelvergiftungen beteiligten Proben die gleichen Enterotoxintypen (A, B, D, E) registriert wie beim Verfahren nach REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974), doch erfolgte keine Bestimmung der Enterotoxinmengen. Infolgedessen kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Toxinkonzentration in diesen Fällen deutlich über 0,1 mcg/100 g lagen. Dennoch sprechen die in geringer Zahl mit den Typen A, C, D und E durchgeführten Versuche dafür, daß negative Enterotoxinnachweise bei der vorgeschlagenen Methodik (Ultrafiltration) für die Unbedenklichkeit des untersuchten Nahrungsmittels sprechen. Diese Aussage ist bei Anwenden einer anderen ebenfalls auf der Ultrafiltration basierenden Methodik (GASPER, 1973) nicht möglich. Nach Angaben dieses Autors waren nämlich bei 0,75 mcg Staphylokokken-Enterotoxin A pro 100 g Lebensmittel bereits einige negative Ergebnisse zu berücksichtigen, bei 0,50 mcg sogar - mit einer Ausnahme (gekochter Schinken) - nur noch negative Resultate. Diese Unterschiede zu den eigenen Werten sind jedoch in erster Linie dadurch bedingt, daß GASPER auf das Lyophilisieren verzichtete und statt der UM 2-Membran die PM 10-Membran zum Einengen des Enterotoxins verwendete. Den eigenen Ergebnissen kann nämlich entnommen werden, daß bei Benützen der UM 10 (die hinsichtlich der nominellen Trenngrenze der PM 10 entspricht) Proben mit 0,5 mcg SEB/100 g ohne Lyophilisieren ebenfalls nicht mehr erfaßt wurden. Vermutlich würden daher auch mit der Methode von GASPER 0,1 mcg Enterotoxin pro 100 g Lebensmittel nachweisbar sein, sofern das Verfahren modifiziert (UM 2 statt PM 10) bzw. durch das Gefriertrocknen ergänzt wird. Zumindest das eigene, die Ultrafiltration nutzende Verfahren dürfte jedoch hinsichtlich der Erfassung geringster, noch krankmachender Enterotoxinmengen den von CASMAN (1967) bzw. REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974) beschriebenen Methoden gleichwer-

tig sein. Einschränkend muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß das vorgeschlagene Verfahren bisher nur an ausgewählten Lebensmitteln (Milch, Wurst, Käse) getestet wurde.

Die Eignung eines Verfahrens zum Abtrennen der Enterotoxine von Lebensmittelbestandteilen und deren Konzentrieren hängt außer von der Erfassung geringster Enterotoxinmengen auch von dem dafür erforderlichen Zeit- und Materialaufwand ab. Für das Durchführen des eigenen Verfahrens waren in der beschriebenen Form (Ultrafiltrationszellen 402 und 52 bzw. 12) drei bis vier Tage (ohne den serologischen Nachweis) erforderlich. Damit ergibt sich zwar gegenüber dem Verfahren von REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974) ein durchschnittlicher Mehraufwand von einem Tag, gegenüber dem Verfahren von CASMAN (1967) aber ein Zeitgewinn. Die für die Ultrafiltration erforderliche Zeit läßt sich jedoch deutlich vermindern, wenn größere Ultrafiltrationszellen (Modell 2 000) verfügbar sind bzw. gleichzeitig mehrere Zellen der oben angegebenen Modelle. Beim Modell 2000 z.B. ist die Durchflußrate nach Angabe der Firma Amicon im allgemeinen viermal so groß wie beim verwendeten Modell 402. Unter optimalen Bedingungen wäre der Zeitaufwand somit kaum größer als beim Verfahren nach REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974). Hinzu kommt, daß beim letztgenannten Verfahren der zum Herstellen des äquilibrierten Amberlite erforderliche zusätzliche Zeitaufwand nicht berücksichtigt ist.

Das zeitaufwendige Lyophilisieren könnte möglicherweise umgangen werden, wenn sich folgender Vorschlag als durchführbar erweisen sollte: Das Retentat der UM 2 (1 ml) wird über eine Filterkerze weiter eingeengt, die für Stoffe mit einem Molekulargewicht von über 1000 nicht durchlässig ist. Voraussetzung wäre jedoch, daß das Einengen unter Druck in relativ kurzer Zeit erfolgen kann. Ein ähnliches, allerdings ohne Druck arbeitendes System stellen die Minicon-Konzentratoren (Amicon) dar.

Hinsichtlich des gesamten Arbeitsaufwandes mit geschulten Arbeits-

kräften ist das eigene Verfahren eher günstiger zu beurteilen als die konventionellen Methoden. Zum einen kann z.B. auf die mit Zentrifugieren verbundene Chloroformextraktion verzichtet werden, zum anderen lassen sich während der Ultrafiltration sonstige Arbeiten durchführen. Es scheint somit der Schluß gerechtfertigt, daß das entwickelte Verfahren unter Einbeziehen der Ultrafiltration eine geeignete Alternative zu den konventionellen Verfahren zum Isolieren der Enterotoxine aus Lebensmitteln darstellt.

5. Zusammenfassung

1. Im ersten Versuchsabschnitt wurde in gemeinsamen Untersuchungen am Institut geprüft, unter welchen Voraussetzungen die Ultrafiltration geeignet ist, hochgereinigtes bzw. teilweise gereinigtes Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) zu konzentrieren.

   Im zweiten Versuchsabschnitt wurde dann unter Berücksichtigen der in den vorhergehenden Modellversuchen erzielten Ergebnisse getestet, ob die Ultrafiltration auch dazu eingesetzt werden kann, geringe in Lebensmitteln vorhandene SEB-Mengen (0,1 mcg/100 g) von anderen Substanzen so abzutrennen und zu konzentrieren, daß sie mit der radialen Doppeldiffusion nachweisbar sind.

2. Die Ultrafiltration mit gerührten Standardzellen (Amicon) erwies sich als ein geeignetes Verfahren zum Konzentrieren von gelöstem SEB. Die Wiedergewinnungsrate wurde in erster Linie durch die Beschaffenheit der Ultrafiltrationsmembranen beeinflußt. Sie war mit 85 - 90 % bei der UM 2-Membran (Amicon) am höchsten. Die UM 10-Membran lag mit 75 - 80 % an zweiter Stelle (SEB gelöst in physiologischer NaCl). Die Art des Lösungsmittels (Barbitalpuffer) spielte eine kleinere Rolle, während dessen pH-Wert ohne große Bedeutung war. Bei nur teilweise gereinigtem SEB wurde eine vergleichbare recovery nur erzielt, wenn die Toxinlösung vor der Ultrafiltration mit Trypsin inkubiert worden war.

3. Bei allen Proben mit 0,25 mcg SEB/100 g bzw. acht von zehn Proben mit 0,1 mcg SEB/100 g Lebensmittel (100 ml Milch) ließ sich SEB im Objektträger-Gel-Diffusionstest (WADSWORTH) nachweisen, wenn folgendes Verfahren zum Extrahieren, Isolieren und Konzentrieren der Enterotoxine zum Einsatz kam: Abbau des in flüssigen Lebensmittelextrakten bzw. Milch enthaltenen Fettes mit Lipase-Proteolyse von Begleitproteinen mit Trypsin-Säurefällung (pH 4,5) störender Lebensmittelbestandteile - Zentrifugation - Ein-

stellen auf pH 7,6 und Abpuffern mit Barbitalpuffer - Ultrafiltration mit einer XM 50-Membran zum Abtrennen von Stoffen mit einem Molekulargewicht über 50 000 - Ultrafiltration mit einer UM 2-Membran zum Konzentrieren des SEB - Lyophilisieren des Konzentrates.

4. Wenn sich die bei einer geringen Probenzahl beobachtete gute Eignung des beschriebenen Verfahrens auch in umfangreicheren Versuchen für die anderen Enterotoxintypen bestätigen läßt, dürfte es eine wertvolle Alternative zu den konventionellen Methoden von CASMAN (1967) bzw. REISER, CONAWAY und BERGDOLL (1974) darstellen.

Summary

1. In the first part of the investigations it has been tested in collaborative experiments, if highly and partially purified staphylococcal enterotoxin B (SEB) can be concentrated by ultrafiltration. Taking into account the results of these experiments it was examined in the second part of the investigations if the ultrafiltration can also be used for separating small amounts of SEB in foods (0.1 mcg/100 g) from higher-molecular-weight solutes and for concentrating these toxins so that they can be detected with the radial double diffusion technique.

2. The ultrafiltration in standard stirred cells (Amicon) proved to be a suitable procedure for the concentration of dissolved SEB. The recovery-rate was primarily influenced by the characteristics of the ultrafiltration membranes. The highest recovery (85-90 %) was obtained with the UM 2-membrane (Amicon), the second best (75 - 80 %) with the UM 10-membrane (SEB dissolved in physiological saline). The nature of the solvent (barbital buffer) is of a minor importance whereas the pH of the solvent was relatively unimportant. Using partially purified SEB a comparable recovery-rate could only be obtained, if the toxin-solution had been incubated with trypsin before ultrafiltration.

3. In all samples containing 0.25 mcg SEB/100 g and eight of ten samples with 0.1 mcg SEB/100 g food (100 ml milk) SEB could be detected with the micro double diffusion slide-technique (modification of WADSWORTH-technique), if the following procedure was used for the extraction, isolation and concentration of the enterotoxin: Enzymatic lipolysis (lipase) - proteolysis of contaminating proteins with trypsin - acid precipitation (pH 4.5) of interfering food components - centrifugation - adjustment to pH 7.6 and buffering with barbital buffer - ultrafiltration with the XM 50-membrane for separation of high-molecular-weight solutes (more

than 50 000)- ultrafiltration with the UM 2-membrane for concentration of SEB - lyophilisation of the concentrate.

4. If the suitability of the described procedure for the other enterotoxin-types (observed in a few experiments) can be confirmed in extensive investigations, it may be a valuable alternative to the conventional methods of CASMAN (1967) and REISER, CONAWAY and BERGDOLL (1974) respectively.

6. Literaturverzeichnis

AVENA, R.M. und M.S. BERGDOLL (1967):
Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, Staphylococcus aureus strain 361.
Biochemistry 6, 1474-1480.

BARBER, L.E. und R.H. DEIBEL (1972):
Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage.
Appl. Microbiol. 24, 891-898.

BENNETT, R.W. (1978):
Persönliche Mitteilung.

BENNETT, R.W., D.L. ARCHER und W.T. AMOS (1974):
Enterotoxin recovery in foods under conditions of polyelectrolyte exclusion.
J. Milk Food Technol. 37, 529.

BENNETT, R.W., S.A. KEOSEYAN, S.R. TATINI, H. THOTA und W.S. COLLINS (1973):
Staphylococcal enterotoxin: A comparative study of serological detection methods.
J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment. 6, 131-134.

BERGDOLL, M.S. (1970):
Enterotoxins.
in: MONTIE, T.C., S. KADIS und S.J. AJL:
Microbial Toxins. Bd. III, S. 265-326.
Academic Press, New York.

DERSELBE (1972):
The enterotoxins.
in: J.O. COHEN:
The staphylococci, S. 301-331.
Verlag John Wiley and Sons, Ic. New York.

DERSELBE (1978):
Persönliche Mitteilung.

BERGDOLL, M.S. und R.N. ROBBINS (1973):
Characterization of types of staphylococcal enterotoxins.
J. Milk Food Technol. 36, 610-612.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA und R.M. AVENA (1965):
Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C.
J. Bacteriol. 90, 1481-1485.

BERGDOLL, M.S., R. REISER und J. SPITZ (1976):
Staphylococcal enterotoxins - detection in food.
Food Technol. 30 (5), 80-82.

BERGDOLL, M.S., H. SUGIYAMA und G.M. DACK (1959):
Staphylococcal enterotoxin. I. Purification.
Arch. Biochem. Biophys. 85, 62-69.

BERGDOLL, M.S., M.J. SURGALLA und G.M. DACK (1959):
Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property.
J. Immunol. 83, 334-338.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.N. ROBBINS und K.F. WEISS (1971):
Identification of enterotoxin E.
Infec. Immun. 4, 593-595.

BORJA, C.R. und M.S. BERGDOLL (1967):
Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by Staphylococcus aureus strain 137.
Biochem. 6, 1467-1473.

CASMAN, E.P. (1960):
Further serological studies of staphylococcal enterotoxin.
J. Bact. 79, 849-856.

DERSELBE (1967):
Staphylococcal food-poisoning.
Health Lab. Sci. 4, 199-206.

CASMAN, E.P. und R.W. BENNETT (1965):
Detection of staphylococcal enterotoxin in food.
Appl. Microbiol. 13, 181-189.

CASMAN, E.P., D.W. McCOY und P.J. BRANDLY (1963):
Staphylococcal growth and enterotoxin production in meat.
Appl. Microbiol. 11, 498-500.

CASMAN, E.P., R.W. BENNETT, A.E. DORSEY und J.A. ISSA (1967):
Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D.
J. Bacteriol. 94, 1875-1882.

COLLINS, W.S., A.D. JOHNSON, J.F. METZGER und R.W. BENNETT (1973):
Rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A.
Appl. Microbiol. 25, 774-777.

DACK, G.M. (1956):
Food poisoning.
Univ. Chicago Press, Chicago.

DANGERFIELD, H.G. (1973):
Effect of enterotoxins after ingestion by humans.
Vortrag, Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.

FEY, H. (1978a):
Staphylokokken-Enterotoxine in Lebensmitteln und deren Nachweis.
Chemische Rundschau 31, 6-9.

DERSELBE (1978b):
Persönliche Mitteilung.

FRIEDMAN, M.E. und J.D. WHITE (1965):
Immunofluorescent demonstration of cell-associated staphylococcal enterotoxin B.
J. Bacteriol. 89, 1155.

GANTZE, K. (1976):
Zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxin in Lebensmitteln mittels Froschspermatest und dem vorgeschalteten Extraktionsverfahren.
Vet. Med. Diss., München.

GASPER, E. (1973):
Detection of staphylococcal enterotoxin A by Laurell electro-immunodiffusion.
Oregon State University, Ph. D. Dissertation.

GENIGEORGIS, C. und J.K. KUO (1976):
Recovery of staphylococcal enterotoxin from foods by affinity chromatography.
Appl. Environ. Microbiol. 31, 274-279.

GILBERT, R.J., A.A. WIENEKE, J. LANSER und M. SIMKOVICOVA (1972):
Serological detection of enterotoxin in foods implicated in staphylococcal food poisoning.
J. Hyg. Camb. 70, 755-762.

HALL, H.E., R. ANGELOTTI und K.H. LEWIS (1963):
Quantitative detection of staphylococcal enterotoxin B in food by gel-diffusion methods.
Public Health Rep. 78, 1089-1098.

DIESELBEN (1965):
Detection of the staphylococcal enterotoxins in food.
Health Lab. Sci. 2, 179-191.

HELBER, W. (1977):
Zur Inaktivierung von Staphylokokkenenterotoxin B mittels chemischer Verfahren.
Vet. Med. Diss., München.

HOLBROOK, R. und A.C. BAIRD-PARKER (1975):
Serological methods for the assay of staphylococcal enterotoxins.
in: BOARD, R.G. und D.W. LOVELOCK:
Some methods for microbiological assay, S. 107-128.
Academic Press, London-New York, San Francisco.

JARVIS, A.W. (1974):
A solid-phase radioimmunassay for the detection of staphylococcal enterotoxins in dairy products.
N. Z. J. Dairy Sci. Tech. 9, 37-39.

JOHNSON, H.M., J.A. BUKOVIC und P.E. KAUFFMANN (1973):
Staphylococcal enterotoxins A and B: Solid phase radioimmunassay in food.
Appl. Microbiol. 26, 309-313.

KIMBLE, C.E. und A.W. ANDERSON (1973):
Rapid, sensitive assay for staphylococcal enterotoxin A by reversed immuno-osmophoresis.
Appl. Microbiol. 25, 693-694.

KUHNT, J. (1974):
Zum Vorkommen von koagulasepositiven Staphylokokken und Enterotoxinen in sauren Milchprodukten.
Vet. Med. Diss., München.

LAURELL, C.B. (1972):
Electroimmuno-assay.
Scan. J. Clin. Lab. Invest. 29, suppl. 124, 21-37.

LINDROTH, S. und A. NISKANEN (1977):
Double antibody solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A.
Europ. J. Appl. Microbiol. 4, 137-143.

LOCHER, E. (1977):
Zur Stabilität von Enterotoxin B gegenüber physikalischen Einflüssen.
Vet. Med. Diss., München.

MANCINI, G., A.O. CARBONARA und J.F. HEREMANS (1965):
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochem. 2, 235-254.

MAYER, S. (1975):
Enterotoxinbildungsvermögen boviner und humaner Staphylokokken unter Berücksichtigung der Antibiotikaresistenz und anderer biologischer Eigenschaften.
Vet. Med. Diss., München.

MILLER, B.A., R.F. REISER und M.S. BERGDOLL (1978):
Detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, and E in foods by radioimmunoassay, using staphylococcal cells containing protein A as immunoadsorbent.
Appl. Environ. Microbiol. 36, 421-426.

MINOR, T.E. und E.H. MARTH (1976):
Staphylococci and their significance in food.
Elsevier scientific publishing company, Amsterdam-Oxford-New York.

NISKANEN, A. und S. LINDROTH (1976):
Comparison of different purification procedures for extraction of staphylococcal enterotoxin A from foods.
Appl. Environ. Microbiol. 32, 455-464.

DIESELBEN (1977):
Suitability of the enzyme treatment and ammonium sulfate precipitation method for detection of staphylococcal enterotoxin from different foods.
Europ. J. Appl. Microbiol. 4, 233-237.

NISKANEN, A. und E. NURMI (1976):
Effect of starter culture on staphylococcal enterotoxin and thermonuclease production in dry sausage.
Appl. Environ. Microbiol. 31, 11-20.

NIYOMVIT, N., K.E. STEVENSON und R.F. McFEETERS (1978):
Detection of staphylococcal enterotoxin B by affinity radioimmunoassay.
J. Food Sci. 43, 735-739.

ORTH, D.S. (1977):
Statistical analysis and quality control in radioimmunassay for staphylococcal enterotoxins A, B, and C.
Appl. Environ, Microbiol. 34, 710-714.

POBER, Z. und G.J. SILVERMAN (1977):
Modified radioimmunoassay determination for staphylococcal enterotoxin B in foods.
Appl. Environ. Microbiol. 33, 620-625.

READ, R.B., W.L. PRITCHARD, J. BRADSHAW und L.A. BLACK (1965a):
In vitro assay of staphylococcal enterotoxins A and B from milk.
J. Dairy Sci. 48, 411-419.

READ, R.B., J. BRADSHAW, W.L. PRITCHARD und L.A. BLACK (1965b):
Assay of staphylococcal enterotoxin from cheese.
J. Dairy Sci. 48, 420-424.

REISER, R., D. CONAWAY und M.S. BERGDOLL (1974):
Detection of staphylococcal enterotoxin in foods.
Appl. Microbiol. 27, 83-85.

REUTER, H. (1975):
Ultrafiltration in der Lebensmittelverarbeitung.
Die Molkereizeitung 29, 915-923.

ROBERN, H., M. DIGHTON, Y. YANO und N. DICKIE (1975):
Double-antibody radioimmunassay for staphylococcal enterotoxin C_2.
Appl. Microbiol. 30, 525-529.

SAUNDERS, G.C. und M.L. BARTLETT (1977):
Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A.
Appl. Environ. Microbiol. 34, 518-522.

SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, J. WAGMAN, L. SPERO, D.A. DUNNERY und M.S. BERGDOLL (1965):
Purification of staphylococcal enterotoxin B.
Biochemistry 4, 1011-1016.

SCHULTE, L. (1978):
Zur Stabilität von Staphylokokkenenterotoxin A gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen.
Vet. Med. Diss., München.

SILVERMAN, S.J., A.R. KNOTT und M. HOWARD (1968):
Rapid, sensitive assay for staphylococcal enterotoxin and a comparison of serological methods.
Appl. Microbiol. 16, 1019-1023.

SIMON, E. (1978):
Verfahren zum schnellen und empfindlichen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin in Lebensmitteln am Modell des Enterotoxin B nach dem ELISA-Prinzip.
Vet. Med. Diss., München.

SIMON, E. und G. TERPLAN (1977):
Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin B mittels ELISA-Test.
Zbl. Vet. Med. B, 24, 842-844.

SINELL, H.-J. und I. MENTZ (1978):
Versuche zur Extraktion von Staphylokokken-Enterotoxinen aus Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 29, 150-155.

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):
Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen.
Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128-137.

SPERO, L., J.-R. WARREN und J.F. METZGER (1973):
Effect of single peptide bond scission by trypsin on the structure and activity of staphylococcal-enterotoxin B.
J. Biol. Chem. 248, 7289-7294.

STOJANOW, I. und N. NESTOROW (1967):
Schnellmethode zur Bestimmung von Staphylokokkenenterotoxin in Fleischerzeugnissen.
XIII. Kongreß der Europäischen Fleischforscher in Rotterdam, 20. - 26. August 1967.

STOJANOW, I.M. und E. SCHENK (1966):
Verfahren zur präparativen Isolierung von Staphylokokken-Enterotoxin aus Lebensmitteln.
Patentschrift 20. Sept. 1966, No. 50 358 (DDR).

DIESELBEN (1970):
Process for the isolation of staphylococci-enterotoxin from foodstuffs. United States Patent Office 3523731 vom 25. Aug. 1970.

THOTA, H., S.R. TATINI und R.W. BENNETT (1973):
Effects of temperature pH and NaCl on production of staphylococcal enterotoxins E and F.
Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. p.1.

TODD, E.C.D. (1978):
Foodborne disease in six countries - A comparison.
J. Food Prot. 41, 559-565.

TROLLER, J.A. und J.V. STINSON (1975):
Influence of water activity on growth and enterotoxin formation by Staphylococcus aureus in foods.
J. Food Sci. 40, 802-804.

UNTERMANN, F. (1978):
Serologische Nachweisverfahren von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 29, 136-137.

WADSWORTH, C. (1957):
A slide microtechnique for the analysis of immune precipitates in gel.
Intern. Arch. Allergy 10, 355-360.

ZAADHOF, K.-J. (1978):
Gegenwärtiger Stand des Nachweises von Staphylokokken-Enterotoxinen in Milch und Milchprodukten.
19. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft.

ZEHREN, V.L. und V.F. ZEHREN (1968):
Examination of large quantities of cheese for staphylococcal enterotoxin A.
J. Dairy Sci. 51, 625-644.

AMICON:
Ultrafiltration; Anleitungen und Katalog.
Selection guide and catalogue (Publikation No. 426).
Applications manual (Publikation No. 427).
Operating instructions (Publikationen I-101 und I-102).
Dialog.
Literature references to the use of Amicon ultrafiltration systems.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (1977):
Foodborne and waterborne disease outbreaks. Annual summary 1976.

Abschließend möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. G. Terplan für das überlassene Thema und seine Anregungen bedanken.

Bei Herrn Dr. K.-J. Zaadhof bedanke ich mich für die Hilfe beim Fertigstellen des schriftlichen Teiles der Dissertation.

Herrn Dr. P. Sommerfeld schulde ich Dank für die einführenden guten Ratschläge auf den Gebieten der Serologie und Immunologie.

Bei den übrigen Mitarbeitern des Institutes will ich mich für die gewährte Hilfe bedanken.

LEBENSLAUF

Am 3. November 1924 wurde ich in München als Sohn des Gastwirtes Georg Schegger und seiner Ehefrau Therese, geb. Ametsbichler, geboren. Nach achtjährigem Besuch der Volksschule an der Bazeillesstraße in München trat ich 1939 in die Städt. Wirtschaftsaufbauschule ein. Im April 1942 unterbrach ich nach Einrücken zum RAD die Ausbildung und leistete ab Januar 1943 meine Wehrdienstpflicht ab. Der folgte vom April 1945 bis Februar 1946 die amerikanische Kriegsgefangenschaft. Nach einem Sonderlehrgang für Kriegsteilnehmer bestand ich im April 1947 die Reifeprüfung an der Gisela-Oberrealschule in München. Der schloß sich nach zweijähriger Ausbildung im April 1949 die Gesellenprüfung für das Brauerhandwerk an. Dem Vertiefen der fachlichen Kenntnisse diente vom November 1949 bis Sommer 1952 das Studium an der "Brauereiwissenschaftlichen Fakultät" Weihenstephan der Technischen Hochschule München. Die Diplomhauptprüfung habe ich mit Zeugnis vom 1. Oktober 1952 bestanden. Bis 1969 war ich dann meist als technischer Angestellter im Brauereigewerbe tätig und begann ab WS 1969/70 mit dem Studium der Tiermedizin an der Universität München. Den dritten Teil der tierärztlichen Prüfung legte ich in München bis einschließlich 18. Oktober 1974 ab.

Im November 1974 überließ mir Herr Professor Dr. G. Terplan vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch ein Promotionsthema. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich vom Bayerischen Staatsministerium des Innern mit dem 11. November 1976.